

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-526421

(P2004-526421A)

(43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
<b>C O 7 K 14/44</b>	C O 7 K 14/44	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/20</b>	C O 7 K 16/20	4 B O 6 3
<b>C O 7 K 19/00</b>	C O 7 K 19/00	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/15</b>	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 118 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-542118 (P2002-542118)	(71) 出願人	503167857
(86) (22) 出願日	平成13年11月9日 (2001.11.9)		セニックス バイオサイエンス ゲー エ
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月8日 (2003.5.8)		ム ペー ハー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/013034		ドイツ連邦共和国 O 1 3 0 7 ドレスデ
(87) 国際公開番号	W02002/038805		ン, フォテンハウアーストラッセ 1 0 8
(87) 国際公開日	平成14年5月16日 (2002.5.16)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	60/246, 750		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成12年11月9日 (2000.11.9)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 真核細胞分裂遺伝子並びに増殖疾患の診断および処置におけるそれらの使用

## (57) 【要約】

本発明は、RNA 媒介干渉 (RNA i) により同定されうる細胞の分裂および増殖工程におけるいくつかの C . e l e g a n s 遺伝子およびそれらの相当する遺伝子産物の顕著な機能的な役割、および、すべてのそれらの生物学的活性誘導体等の前記遺伝子の機能的オルトログの同定および単離に関連する。

本発明は、抗増殖剤の開発または単離における (前記オルトログ等の) 前記遺伝子および遺伝子産物の使用、特に適切なスクリーニングアッセイにおける使用、および増殖疾患の診断および処置のための使用に、さらに関連する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下からなる群より選ばれる核酸配列を含む、細胞の分裂および増殖に機能的に関与するポリペプチドをエンコードする単離された核酸分子およびそれらのフラグメント：

(a) 配列番号 1 から 3、配列番号 4 から 5、配列番号 6 から 7、配列番号 12 で表される核酸配列およびそれらのフラグメント並びにそれらの相補鎖、

(b) 配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、または配列番号 13 の 100 残基以上の少なくとも 25% と配列同一性を示すポリペプチドをエンコードする核酸配列、および / または、最大  $10^{-30}$  の e 値によりブラスト配列分析プログラムを用いたコンピューター検索により検出可能な核酸配列、

(c) 中程度 / 高度にストリンジェントな条件下で (a) または (b) の核酸配列にハイブリダイズできる核酸配列、

(d) (a)、(b) または (c) で規定されるいずれかの配列に対する遺伝子コードの結果として縮退した核酸配列。

10

**【請求項 2】**

検出可能なラベルを含む少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、請求項 1 に規定された核酸配列を含む核酸プローブ。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の単離された核酸分子またはそれらのフラグメントを中に取り込んで有する組み換えベクターまたは核酸構築物。

20

**【請求項 4】**

発現ベクターである、請求項 3 に記載のベクター。

**【請求項 5】**

請求項 1 に記載の単離された核酸分子または請求項 3 に記載の組み換えベクター若しくは核酸構築物を遺伝子工学によって中に取り込んだ宿主細胞。

**【請求項 6】**

請求項 4 に記載の発現ベクターを中に取り込んで有する、請求項 5 に記載の宿主細胞。

**【請求項 7】**

請求項 1 に記載の単離された核酸分子若しくはそれらのフラグメント、または請求項 2 に記載のプローブ、を適切な容器内に含むアッセイキット。

30

**【請求項 8】**

細胞の分裂および増殖に機能的に関与するポリペプチドまたはそれらのフラグメントを宿主細胞内で産生する以下の工程を含む方法：

(a) 請求項 4 に記載の発現ベクターを適切な宿主細胞に移入すること、

(b) 前記ポリペプチドまたはそれらのフラグメントの発現が起こる条件下で工程 (a) の宿主細胞を培養すること、

(c) 任意に、発現したポリペプチドを培地に分泌させること。

**【請求項 9】**

配列番号 1 から 3、配列番号 4 から 5、配列番号 6 から 7、配列番号 11 で表される核酸配列を含む遺伝子のオルトログを単離するための、請求項 2 に規定されたプローブの使用。

40

**【請求項 10】**

細胞の分裂および増殖に機能的に関与するポリペプチドまたはそれらのフラグメントを産生するための、請求項 1 に規定された単離された核酸分子またはそれらのフラグメントの使用。

**【請求項 11】**

細胞の分裂または増殖を阻害し、刺激し、またはもたらす相互作用薬のスクリーニングアッセイにおける、請求項 1 に規定された核酸分子若しくはそれらのフラグメントまたは請求項 2 に記載のプローブの使用。

**【請求項 12】**

50

異常および／または過剰な細胞の分裂または増殖と関連した疾患の診断または処置のための方法における、請求項 1 に規定された核酸分子または請求項 2 に記載のプロープの使用。

【請求項 13】

疾患が、冠状動脈再狭窄または、リンパ腫、肺癌、結腸癌、卵巣癌および乳癌からなる群より選ばれる腫瘍性疾患である、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

以下からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む、細胞の分裂および増殖に機能的に関与するポリペプチドまたはそれらのフラグメント：

(a) 配列番号 8、9、10、11 および 13 で表されるアミノ酸配列およびそれらのフラグメント、

(b) (a) の配列の 100 残基以上の少なくとも 25% と配列同一性を示すアミノ酸配列、および／または、最大  $10^{-30}$  の e 値によりブラスト配列分析プログラムを用いたコンピューター検索により検出可能なアミノ酸配列、

(c) 請求項 1 に規定された核酸配列 (c) - (d) のいずれかによりエンコードされたアミノ酸配列。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のポリペプチドまたはそれらのフラグメントを含む融合タンパク質。

【請求項 16】

請求項 14 に記載のポリペプチドまたはそれらの免疫原部分に特異的に結合する能力を有する抗体またはそれらのフラグメント。

【請求項 17】

請求項 14 に記載のポリペプチドまたはそれらの免疫原部分に特異的に結合する能力を有するヒト化抗体。

【請求項 18】

請求項 14 に記載のポリペプチド、請求項 15 に記載の融合タンパク質、請求項 16 および／または 17 に記載の抗体を、適切な容器内に含むアッセイキット。

【請求項 19】

細胞の分裂または増殖を阻害し、刺激し、またはもたらす相互作用薬のスクリーニングアッセイにおける、請求項 14 に記載のポリペプチド、または、請求項 16 若しくは 17 に記載の抗体、の使用。

【請求項 20】

相互作用薬のスクリーニングアッセイが以下の工程を含む、請求項 19 に記載のポリペプチドまたは抗体の使用：

1. 宿主細胞内での前記ポリペプチドの組み換え発現
2. 工程 1 で組み換えにより発現したポリペプチドの単離および任意の精製
3. 任意に、前記ポリペプチドと相互作用することを試験される薬のラベル化、および／または、組み換えにより発現したポリペプチドのラベル化
4. 組み換えにより発現したポリペプチドの固相への固定化
5. 相互作用する可能性のあるパートナーまたはそれらの変種のポリペプチドへの結合
6. 任意に、1 またはそれ以上の洗浄工程
7. 相互作用の、特にバックグラウンドレベルを超えて固相に結合して留まっているラベルの量をモニターすることによる、検出および／または定量。

【請求項 21】

異常および／または過剰な細胞の分裂または増殖と関連した疾患の診断または処置のための方法における、請求項 14 に記載のポリペプチド、請求項 14 に規定されたアミノ酸配列、または請求項 16 若しくは 17 に記載の抗体、の使用。

【請求項 22】

疾患が、冠状動脈再狭窄または、リンパ腫、肺癌、結腸癌、卵巣癌および乳癌からなる群より選ばれる腫瘍性疾患である、請求項 20 に記載の使用。

## 【請求項 23】

コンピュータモデル、構造モデルまたは薬の結合および効果を評価するための他のモデルを開発するための、請求項 1 に規定された核酸配列または請求項 14 に規定されたアミノ酸配列の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

第 1 の見地として、本発明は、RNA 媒介干渉 (RNAi) により同定されうる細胞の分裂および増殖工程におけるいくつかの C. elegans 遺伝子およびそれらに相当する遺伝子産物の顕著に機能的な役割に関連する。

10

## 【0002】

第 2 の見地として、本発明は、他の真核種、特に人間に見出される前記遺伝子およびそれらの遺伝子産物の、それらのすべての生物学的活性誘導体を含む、機能的オルトログの同定および単離に関連する。

## 【0003】

第 3 の見地として、本発明は、(前記オルトログを含む) 前記遺伝子および遺伝子産物の抗増殖剤の開発または単離における使用、例えば、それらの適当なスクリーニングアッセイへの使用および増殖疾患の診断および処置の方法への使用、を含む。

## 【0004】

第 4 の見地として、本発明は、前記遺伝子産物に対する抗体、並びに、抗増殖剤の開発若しくは単離および増殖疾患の診断および処置の方法へのそれらの使用に関連する。

20

## 【0005】

第 5 の見地として、本発明は、構造モデルまたは薬の結合および効率を評価するための他のモデルを開発するためのこれらの遺伝子および遺伝子産物の使用、並びに、ここに記載される新しい機能に由来する他のいずれかの使用、および、本出願の開示からいずれの当業者に対しても明白となる他のいずれかの使用に関連する。

## 【背景技術】

## 【0006】

後生動物の細胞分裂は、非常に複雑で、高度に制御された細胞工程の集合であり、娘細胞に細胞物質を正しく受け渡すことができるように、厳しく調整され、完全に時期を合わせ、厳密にモニターされる必要がある。これらの工程の欠陥は、すべての形態の癌を含む、幅広いいわゆる増殖疾患の原因となることが知られている。細胞分裂は数少ない細胞の 1 つで示されるので、すべての形態の癌の病因に共通する唯一の細胞工程ではなくても、その特異的阻害は、治療の介入の好ましい部位として認識されてきた。有糸分裂阻害剤は化学療法剤の最も有望な種類の 1 つとして認められているが、この種類の新しい医薬候補物質を見つけるスクリーニングの試みは、単一のタンパク質であるチューブリンを標的とする物質を同定するためのこのようなスクリーニングの強い固有の傾向により、徐々に害されてきた。チューブリンは、微小管を形成するように重合し、これは紡錘体の機能および染色体の分離に必要な主要な細胞骨格素子である。しかし、微小管の機能は、分裂しているかどうかにかかわらず、ほとんどすべての細胞型において遍在する必要がある、従って、抗チューブリン薬により引き起こされる多くの望まない副作用を示すという事実が示される。

30

40

## 【0007】

チューブリンを標的とする非常に成功した抗腫瘍薬の最もよく知られた例は、おそらくパクリタキセル、およびブリストルマイヤーズスクイブから販売されたその誘導体である、タキソールである。その適用可能性は、問題のある副作用の広さのために、十分な投薬計画を決定することの困難性により、実際非常に制限される。タキソール処置は、臨床試験で 2 - 4 % の患者において、呼吸困難、処置を必要とする低血圧症、血管性浮腫、および全身性じんま疹により特徴づけられるアナフィラキシーおよび重篤な過敏症をもたらした。すべてのタキソールは、コルチコステロイドによる前処置の後に投与され、前処置にも

50

かわらず、致命的な反応が起こった。生命に関わる心臓性不整脈をもたらす重篤な誘導された異常が患者の1%以下において起こり、ペースメーカーの挿入により処置される必要がある。タキソールは、妊婦において胎児の傷害または胎児の死亡を引き起こす可能性がある。さらに、投与は、一般的に、頻脈、低血圧、潮紅、皮膚反応および息切れ（軽度の呼吸困難）を伴う。

#### 【0008】

これらの短所にもかかわらず、タキソールは、この30年間に於ける最も成功した新しい抗癌治療剤として、多くの人から認められてきた。確かに、癌を処置するために用いられる有糸分裂阻害剤の一覧に加える試みは、正当化される。しかし、チューブリンを標的とする、または微小管の動態を妨害するさらなる薬は、タキソールと同様の適用可能性および制限を有すると予期される。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

従って、本発明の課題は、有糸分裂の完結に不可欠なチューブリン以外の、治療薬に対する新しい可能性のある標的タンパク質/遺伝子を見つけることである。これらのタンパク質/遺伝子は、新しい抗腫瘍または細胞毒性抗癌剤をスクリーニングするための新規な標的を提供しうる。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

残念ながら現在まで、後生動物において遺伝子スクリーニング方法を用いるこのような標的タンパク質/遺伝子の系統的な同定は困難であり、単細胞酵母の使用に強く依存してきた。ある後生動物モデル生物、特に線虫 *Caenorhabditis elegans* の使用におけるいくつかの主要な有利な点が、この溝の架け橋となる新しい方法を提供し始めている。

#### 【0011】

有糸分裂工程に關与するチューブリン以外の治療薬に対する新しい可能性のある標的タンパク質/遺伝子を見つけるための本発明の上述した課題は、胚細胞分裂の第1期を記録するための高く評価された顕微鏡アッセイと組み合わせた「ゲノムRNA媒介干渉(RNAi)」に基づく *C. elegans* におけるスクリーニングアッセイにより解決される (Sulston et al., 「線虫 *Caenorhabditis elegans* の胚細胞直系」、Dev. Biol. 100, 64-119 (1983); Gonczy et al., 「変異解析による1つの細胞段階の *Caenorhabditis elegans* 胚における細胞分裂工程の解剖」、J. Cell Biol. 144, 927-946 (1999))。これらの技術の組み合わせにより、選択された遺伝子および選択された遺伝子の変種は、前例のない速度および効率で機能的に特徴づけることができる。

#### 【0012】

線虫 *C. elegans* は、その發育を通じてほとんど全体に透明な身体を示し、それにより胚形成の最も初期の段階でさえ、鋭敏で詳細な細胞学的記録のための比類ない顕微鏡によるアクセスを提供する。この重要な性質は、その短いライフサイクル(3-5日)、培養の容易さ、維持費の低さとともに、*C. elegans* をおそらくすべての後生動物の中で最も研究されたものにするのを助けてきた。また、配列データは、*C. elegans* ゲノムの97%以上が現在利用可能である (*C. elegans* 配列決定コンソーシアム、「線虫 *C. elegans* のゲノム配列：生物学の研究のためのプラットフォーム」、Science 282, 2012-2018 (1998))。従って、*C. elegans* は、RNA媒介干渉(RNAi)の新しい技術を適用するための理想的な生物であることが証明された。この技術は、目的とするコード配列部分に対応する2本鎖RNA(dsRNA)分子の成虫への導入により媒介される、標的化された、遺伝子発現の配列特異的阻害にある (Fire et al., 「*Caenorhabditis*

*i s e l e g a n s*における2本鎖RNAによる有能な特異的遺伝子干渉」、*N a t u r e* 391, 806-811 (1998))。現在までに試験されている*C . e l e g a n s* 遺伝子の大部分について、これが標的化された遺伝子発現の配列特異的阻害を生ずることが示され、処置された虫のF1後代(およびいくつかの場合には、処置された虫そのもの)において、明らかに検出可能な機能を失った表現型を伴う。

#### 【0013】

大規模なRNAi技術に基づいたスクリーニングは、*G o n c z y e t a l .*, 「染色体IIIの遺伝子のRNAiを用いた*C . e l e g a n s*における細胞分裂の機能的遺伝的分析」、*N a t u r e* 408, 331-336 (2000)に詳細に記載されている、*C . e l e g a n s*の染色体IIIの予測されたオープンリーディングフレームの2,232(96%であることを意味する)について行われた。この大規模スクリーニング実行のために、個々のオープンリーディングフレームに対応する2本鎖RNAが作成され、成虫の*C . e l e g a n s*雌雄同体個体にマイクロインジェクトされ、得られた胚は経時的DIC顕微鏡検査法を用いて24時間後に分析された。

10

#### 【0014】

他に加え、*C . e l e g a n s* 遺伝子H38K22.2(*G e n b a n k / E M B L* ID:AL024499;配列番号1-3で提供される)、C02F5.1(*G e n b a n k / E M B L* ID:L14745;配列番号4および5で提供される)およびF10E9.8(*G e n B a n k / E M B L* ID:L10986;配列番号6および7で提供される)は、DICアッセイにより検出可能な表現型を生じ、後生動物の細胞分裂工程におけるこれらの遺伝子の機能的役割を示した。

20

#### 【0015】

少なくとも1つの場合(H38K22.2)において、構造的および機能的に相同性の遺伝子、いわゆるオルトログ遺伝子を、他の種において、特に*H o m o s a p i e n s*において、主としてヒトオルトログRP42を同定することも可能となった。

#### 【0016】

RP42遺伝子のマウスオルトログについては、遺伝子が強く発育的に調節された発現を、特に新皮質ニューロンの起点となる神経芽細胞の増殖において、示すことが知られているにすぎなかった(*M a s e t a l .*, 「新規遺伝子RP42のクローニングおよび発現、6Q16の自閉感受性座へのマッピング」、*G e n o m i c s* 1; 65 (1), 70-74 (2000))。増殖疾患の診断および/または治療に対する薬の開発または同定のための優秀な道具として使う細胞の分裂および増殖工程におけるPR42の機能的役割は、今までのところ知られていない。

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0017】

細胞の分裂および増殖における前記遺伝子の基本的な機能を用い、これらの新たに同定された標的遺伝子およびそれらに対応する遺伝子産物、それらのいずれもの相同体、オルトログおよび誘導体は、抗増殖剤等の幅広い治療の開発および単離、並びに増殖疾患の診断および処置の方法の開発、に使用する優秀な道具であることを示す。

#### 【0018】

従って、第1の見地として、本発明は、以下からなる群より選ばれる核酸配列を含む、細胞の分裂および増殖に機能的に関与するペプチドをエンコードする単離された核酸分子またはそれらのフラグメントに関する：

40

(a) 配列番号1から3、配列番号4から5、配列番号6から7で表される核酸配列およびそれらのフラグメント並びにそれらの相補鎖、

(b) 配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、または配列番号13の100残基以上の少なくとも25%と配列同一性を示すポリペプチドをエンコードする核酸配列、および/または、最大 $10^{-30}$ のe値によりブラスト配列分析プログラムを用いたコンピューター検索により検出可能な核酸配列、

(c) 中程度にストリンジェントな条件下で(a)または(b)の核酸配列にハイブリ

50

ダイズできる核酸配列、

(d) (a)、(b)または(c)で規定されるいずれかの配列に対する遺伝子コードの結果として縮退した核酸配列。

【0019】

上述した単離された核酸分子のフラグメントは、少なくとも15ヌクレオチドおよび好ましくは少なくとも20ヌクレオチドを含んでもよい。

【0020】

さらに、上述の単離された核酸分子は、1本鎖または2本鎖DNA分子、同様に1本鎖または2本鎖RNA分子でもよい。

【0021】

(a) :

(a)で述べた細胞の分裂および増殖に機能的に関与するポリペプチドをエンコードするそれらの核酸分子の核酸配列は、

配列番号1-3 (C. elegans 遺伝子 H38K22.2 (Genbank/EMBL ID: AL024499))、

配列番号4および5 (C. elegans 遺伝子 C02F5.1 (Genbank/EMBL ID: L14745))、

配列番号6および7 (C. elegans 遺伝子 F10E9.8 (GenBank/EMBL ID: L10986)) および

配列番号12 (ヒトH38K22.2 オルトログ、RP42 タンパク質 (NCBI アクセッション番号 AF292100))

として、配列表に提供される。

【0022】

これらの標的遺伝子に対応した推定アミノ酸配列は、(H38K22.2a に対して) 配列番号8、(H38K22.2b に対して) 配列番号9、(C02F5.1 に対して) 配列番号10、(F10E9.8 に対して) 配列番号11、および(RP42 に対して) 配列番号13に開示される。

【0023】

(b) :

さらに、本発明はまた、配列番号1から7または12に開示された上記標的遺伝子の少なくとも1つの構造的および機能的相同性対(特にオルトログ)である単離された核酸分子を含む。

【0024】

それらの相同性核酸分子は、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11または配列番号13の100残基以上の少なくとも25%、好ましくは100残基以上の少なくとも30%、より好ましくは100残基以上の少なくとも35%、最も好ましくは100残基以上の少なくとも40%と、配列同一性を示すポリペプチドをエンコードしうる。

【0025】

図5は、前述の配列同一性が、配列番号8-11および13で表される標的タンパク質のオルトログとしてのポリペプチドを同定するために適した顕著な相同性であることを示す。図5は、ブラスト配列分析プログラムにより得られたタンパク質レベルでのH38K22.2aファミリーの多重配列アライメントを示す。このアライメントでは、2つのC. elegans スプライス変種H38K22.2aおよびH38K22.2bを、キイロシヨウジョウバエ(CG7427)、マウス(AAF04863)およびHomo sapiens(AAH09478)におけるそれらに対応するオルトログと比較している。このアライメントの図5における統計値は、C. elegans クローンH38K22.2aとそのヒトオルトログ(AAH09478)との間のタンパク質レベルにおける配列同一性が299残基以上で36%であることを示す。同様に、C. elegans クローンH38K22.2b(他のスプライス変種)とそのヒトオルトログとの間の配列同一性は、238残基以上で36%である。これらの配列相同性が顕著な相同性であり、それゆえ

10

20

30

40

50

アクセッション番号 A A H 0 9 4 7 8 のヒトクローンが C . e l e g a n s クローン H 3 8 K 2 2 . 2 a および H 3 8 K 2 2 . b のヒトオルトログであると明確に同定されることは、当業者に明白である。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、最大  $10^{-3.0}$  の e 値、好ましくは最大  $10^{-3.5}$  の e 値、より好ましくは最大  $10^{-4.0}$  の e 値で、ブラスト配列分析プログラムの 1 つを用いたコンピュータ検索により検出可能な単離された核酸分子を含む。

【 0 0 2 7 】

図 5 は、前述の e 値が、配列番号 8 - 1 1 および 1 3 で表される標的タンパク質のオルトログとしてのポリペプチドを同定するために適した顕著な配列相同性を特徴づけることを示す。 10

【 0 0 2 8 】

ブラスト配列分析プログラムは、公衆に利用可能で当業者のいずれにも知られた配列分析に用いられるプログラムである。配列アライメントがブラスト配列分析プログラムにより検索される場合、それらのプログラムのほとんどは、比較される配列間の相同性の程度を特徴づけるためのいわゆる「e 値」を計算する。一般的に、小さい e 値は、高い配列同一性 / 相同性を特徴づけ、これに対して大きな e 値は、低い配列同一性 / 相同性を特徴づける。

【 0 0 2 9 】

「相同性」は、2つの知られた配列間の同一性の度合いを意味する。上述したように、配列同一性を意味する相同性は、この分野で知られたコンピュータプログラムを用いて適切に決定されうる。配列変種に必要とされる相同性の度合いは、配列の意図される使用に依存しうる。配列の機能を改善するためや、または方法論的な有利な点を提供するために設計された変位、挿入および欠失の変位を実行することは、まさに当業者の能力範囲内のことである。 20

【 0 0 3 0 】

( c ) :

本発明は、中程度 / 高度にストリンジェントな条件下で ( a ) または ( b ) の核酸配列にハイブリダイズできる単離された核酸配列またはそれらのフラグメントに、さらに関連する。 30

【 0 0 3 1 】

第 1 と第 2 の核酸分子間の配列同一性の程度は、第 1 の核酸分子がある条件下で第 2 の核酸分子にハイブリダイズする能力により特徴づけることもできる。

【 0 0 3 2 】

所定の DNA や RNA 配列が特定のポリペプチドまたはオリゴヌクレオチドプローブに「ハイブリダイズ」するかどうかを決定するための適切な実験条件は、ハイブリダイゼーションを試験するための DNA または RNA を含むフィルターを  $5 \times \text{SSC}$  (塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム) バッファーに 10 分間あらかじめ浸漬し、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$  デンハード溶液、 $0.5\%$  SDS および  $100 \text{ mg/ml}$  の変性して超音波処理された鮭精子 DNA (Maniatis et al., 1989) 中においてフィルターのプレハイブリダイゼーションを行い、その後濃度  $10 \text{ ng/ml}$  の無作為にプライミングした (Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem. 132: 6-13)、 $^{32}\text{P}$ -dCTP ラベル化された (特異活性  $> 1 \times 10^9 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ ) プローブを含む同じ溶液中で、約 45 で 12 時間ハイブリダイゼーションすることを伴う。その後、フィルターは、少なくとも 55 で (低度のストリンジェンシー)、少なくとも 60 度で (中程度のストリンジェンシー)、好ましくは少なくとも 65 で (中程度 / 高度のストリンジェンシー)、より好ましくは少なくとも 70 で (高度のストリンジェンシー) または最も好ましくは少なくとも 75 で (非常に高度のストリンジェンシー)、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\%$  SDS 中で 30 分間 2 回洗浄される。選択された条件下でプローブがハイブリダイズする分子は、x 線フィ 40 50



ルムを用いて検出される。

【0033】

(d) :

本発明は、(a)、(b)または(c)で規定されるいずれかの配列に対する遺伝子コードの結果として縮退した、単離された核酸配列またはそれらのフラグメントに、さらに関連する。

【0034】

自動遺伝子合成の適用は、自然発生する遺伝子の配列変種を作成する機会を提供する。例えば、同じ遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドは、ここで同定される自然発生するポリヌクレオチド配列に示されるコドンの代わりに同義のコドンを使うことにより作成することが、認識されるであろう。このような配列は、自然発生する配列に対する「縮退」と呼ばれる。さらに、対応するアミノ酸配列の合成変種をコードするポリヌクレオチドは、例えば、1またはそれ以上のアミノ酸の置換、欠失または付加の結果として作成する。また、例えば反応性または検出可能な基等の望ましい特性を有する前記ヌクレオチド配列を提供する1またはそれ以上の(モーフオリノス等の)合成ヌクレオチド誘導体を含む核酸分子も、調製することができる。望ましい性質を有する合成誘導体には、対応するポリペプチドも含まれる。自然発生する配列の生物学的活性の少なくとも1部分を示し、または例えば相同性遺伝子若しくは遺伝子産物の同定のためのプローブ等の、なお使用するのに適した、上記に同定された遺伝子および遺伝子産物のすべてのこのような誘導体およびフラグメントは、本発明の範囲内に含まれる。

10

20

【0035】

ここで提供された細胞の分裂および増殖に機能的に関与する種々の遺伝子のヌクレオチド配列を有することにより、遺伝子の合成および/または増幅の自動化技術を用いて *in vitro* で前記核酸分子を単離できることが認識される。いくつかのコード配列の長さのために、自動合成の適用は段階的な遺伝子構築を必要とし、ここで長さ約300ヌクレオチドまでの遺伝子領域は個々に合成され、そして最終組立のために正しい順番で結紮される。個々に合成された遺伝子領域は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて、組立の前に増幅することができる。PCR増幅の技術を用いて、最終遺伝子/核酸分子のすべてまたは一部を直接作成してもよい。この場合、プライマーは、1つの片またはお互いに結紮するいくつかの片のいずれかで、最終産物のPCR増幅を開始できるものとして合成される。この目的のために、cDNAまたはゲノムDNAのいずれかを、PCR増幅のテンプレートとして用いてもよい。cDNAテンプレートは、市販のまたは自作のcDNAライブラリー由来のものでよい。

30

【0036】

第2の見地として、本発明は、検出可能なラベルを含む少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである、(a)から(d)の下で前記に特徴づけた核酸配列を含む核酸プローブに関連する。

【0037】

これらの核酸プローブは、標準的な工程に従ってDNA合成器の使用により、または長い配列については好ましくは、選択されたテンプレート配列および選択されたプライマーを用いたPCR技術の使用により、合成してもよい。プローブとしてのヌクレオチド配列の使用においては、特定のプローブを、放射性および非放射性ラベル等の当業者に知られたいずれの適切なラベルを用いてラベル化してもよい。典型的な放射性ラベルには、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S等が含まれる。放射性同位体によりラベル化されたプローブは、DNAaseおよびDNAポリメラーゼを用いた通常のニクトランスレーション反応によりDNAテンプレートから構築できる。非放射性ラベルには、例えば、ビオチンやチロキシンのようなリガンド、または、種々の発光または蛍光物質が含まれる。プローブは、両端を異なる型のラベルで、例えば一方の末端を同位体ラベルでもう一方の末端をビオチンラベルで、ラベル化してもよい。そして、ラベル化されたプローブおよびサンプルは、ハイブリダイゼーションバッファー溶液中で組み合わされ、アニーリングが起こるまで適切な温

40

50

度に保持される。

【0038】

本発明はまた、上記に規定された単離された核酸若しくはそれらのフラグメント、または上記に規定されたプローブのいずれかを適切な容器内に含むアッセイキットを含む。

【0039】

2本鎖の形成および安定性は、ハイブリッドの2本鎖間の実質的な相補性に依存し、ある度合いのミスマッチが許容される。従って、前記配列変種が目的とする標的ヌクレオチド配列との安定なハイブリッドの形成を許容するもとの配列に対する実質的な配列相同性をなお有する限りは、本発明の核酸分子およびプローブには、上記に規定された配列の(単一および複数双方の)変位、欠失、挿入、およびこれらの組み合わせを含んでもよい。

10

【0040】

細胞の分裂および増殖またはそれらの1部に機能的に関与するポリペプチドをコードする上記に規定された核酸分子およびプローブは、相同体、特にオルトログ、同一若しくは異なる種の遺伝子、を同定するための使用、細胞の分裂若しくは増殖を阻害し、刺激し若しくはもたらす相互作用薬の同定のためのスクリーニングアッセイにおける使用、コンピュータモデル、構造モデルまたは薬の結合および効率を評価するための他のモデルの開発のための使用、異常および/または過剰な細胞の分裂または増殖に関連した疾患、特に充実性腫瘍および造血癌の双方等の腫瘍性疾患または冠状動脈再狭窄の検出または処置のための診断的または治療的使用、を含む幅広い有用な応用を有するであろう。例示的な腫瘍性疾患には、腺癌および黒色種のような癌腫; 神経芽腫および網膜芽腫のような中胚様腫瘍; 肉腫および種々の白血病; およびリンパ腫、が含まれる。特定の対象としては、乳房、卵巣、胃腸管、肝臓、肺、甲状腺、前立腺、脳、脾臓、尿路、および唾液腺の腫瘍がある。またより具体的には、乳房、卵巣、肺、結腸、およびリンパ腫の腫瘍が企図される。

20

【0041】

第3の見地として、本発明は、診断の目的のための上記に同定した核酸分子およびプローブの使用に関連する。上記に同定した核酸分子およびプローブの診断的使用には、生物学的プローブ(好ましくは、限定されないが細胞抽出物、体液等)の前記標的遺伝子の発現の定量的検出、特に上記に特徴づけられた核酸配列(特にcDNA、RNA)を含む内因性核酸分子への定量的ハイブリダイゼーションによる定量的検出が含まれるが、これらに限定されない。細胞分裂に関与する前記標的遺伝子の異常および/または過剰な発現は、その方法により診断してもよい。

30

【0042】

第4の見地として、本発明は、治療目的のために上記に同定された核酸分子、プローブまたはそれらの対応するポリペプチドの使用に関連する。

【0043】

上記に同定された核酸分子、プローブまたはそれらの対応するポリペプチドのこの治療への使用には、前記標的遺伝子の発現の直接または間接の阻害、および/または前記標的遺伝子の機能の阻害、のための前記核酸分子およびそれらの対応するポリペプチドの使用を含んでもよいが、これらに限定されない。特に遺伝子治療ベクター、例えば、上記に同定された配列を有するウイルス、裸のまたは包含されたDNAまたはRNA(例えば、アンチセンスヌクレオチド配列)は、治療目的のために、増殖疾患または細胞分裂に影響する疾患を患っている個体の身体に導入するのに適しているであろう。

40

【0044】

上記に同定された核酸分子またはプローブの特に好ましい治療への使用は、特にヒトまたはヒト細胞における、RNAi技術の治療への適用における使用に関連する。

【0045】

2本鎖RNAオリゴヌクレオチドは、2本鎖におけるいずれのRNA鎖にも高度に相同性を有する遺伝子の発現の沈黙化をもたらす。最近の発見により、もともとはC. elegansにおいて発見された、RNA干渉(RNAi)と呼ばれるこの効果が、細胞、特にヒト細胞においても観察されることが、明らかとなった。従って、本発明は、他の種の細

50

胞、特にヒト細胞において、細胞の分裂または増殖に關与する遺伝子発現の治療的沈黙化のための、上記に同定された((a)から(d)で挙げられた)ヌクレオチド配列、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド(nt)の長さの、より好ましくは少なくとも20ntの長さの、2本鎖RNAオリゴヌクレオチドの使用をさらに含む。この治療の使用は、特に異常および/または過剰な細胞の分裂または増殖に關連する疾患、特に冠狀動脈再狭窄またはリンパ腫、肺癌、結腸癌、卵巣癌および乳癌から成る群より選ばれる腫瘍性疾患を患っている個体の細胞に適用する。

#### 【0046】

第5の見地として、本発明は、(a)から(d)で規定された核酸分子またはそれらのフラグメントを取り込んで有する核酸構築物または組み換えベクターをさらに含む。

10

#### 【0047】

「核酸構築物」は、ここで1本鎖または2本鎖のいずれかの、どのような核酸分子としても規定され、その核酸配列は自然に起こらない様式で組み合わせられ、並列される。ベクターは、組み換えDNA工程に便利に用いることができるいずれのベクターでもよい。ベクターの選択は、取り込まれる宿主細胞に通常依存する。ベクターは、染色体外の独立体でもよく、例えばプラスミド等の、その複製が染色体の複製に独立なものでよい。その代わりに、ベクターは、宿主細胞に導入される場合に、宿主細胞ゲノムに統合され、統合された染色体とともに複製されるものであってもよい。

#### 【0048】

ベクターは、好ましくは、(a)から(d)で規定された核酸分子またはそれらのフラグメントが非相同性のまたは相同性の制御配列に操作可能に結合した、発現ベクターである。「制御配列」の用語は、ここでコード核酸配列の発現に必要なまたは有利なすべての成分を含むように規定される。このような制御配列には、プロモーター、リボソーム結合部位、翻訳開始および終止シグナルおよび、任意に、抑制遺伝子または種々の活性化遺伝子が含まれるが、これらには限定されない。制御配列は、目的とするコード核酸配列と自然に結合する場合は「相同性」と呼ばれ、これが起こらない場合は「非相同性」と呼ばれる。「操作可能に結合した」の用語は、配列がそれらの意図された目的、即ち望むタンパク質の発現、に対して協調して機能するように配置されていることを示す。

20

#### 【0049】

プロモーターは、選択された宿主細胞において転写活性を示し、宿主細胞に相同性または非相同性のいずれかのタンパク質をエンコードする遺伝子由来のいずれのDNA配列でもよい。

30

#### 【0050】

バクテリア宿主における転写を誘導するための適切なプロモーターの例は、例えば、ファージラムダP<sub>R</sub>またはP<sub>L</sub>プロモーター、E. coliのlac、trpまたはtacプロモーター、Bacillus subtilisのアルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター、またはBacillus licheniformisのアルファアミラーゼ遺伝子である。

#### 【0051】

哺乳動物細胞の転写を誘導するための適切なプロモーターの例は、例えば、SV40プロモーター(Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1 (1981), 854-864)、MT-1(メタロチオネイン遺伝子)プロモーター(Palmiter et al., Science 222 (1983), 809-814)またはアデノウイルス2主要後期プロモーターである。

40

#### 【0052】

昆虫細胞における使用のための適切なプロモーターの例は、例えば、ポリヘドリンプロモーター(Vasudev et al., Febs. Lett 311, (1992), 7-11)、オートグラフィカリフォニカポリヘドロシス基本タンパク質プロモーター(EP 397 485)、またはバキュロウイルス極初期遺伝子1プロモーター(US 5,155,037, US 5,162,222)である。

50

## 【0053】

酵母細胞における使用のための適切なプロモーターの例には、酵母解糖遺伝子からのプロモーター (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 1203-12080; Alber および Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419-434) および ADH2-4c プロモーター (Russell et al., Nature 304 (1983), 652-654) が含まれる。

## 【0054】

コード配列は、必要であれば、ヒト成長ホルモントर्मネーター (Palmiter et al., Science 222, 809-814 (1983)) のような適切なターミネーター、またはポリアデニル化配列に操作可能に結合させてもよい。また、発現したタンパク質の分泌ができるように、シグナル配列をコード配列の前に置いてもよい。

## 【0055】

さらに、ベクターは、当該宿主細胞中でベクターが複製できるようにする DNA 配列を含んでもよい。このような配列の例は、プラスミド pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1 および pIJ702 の複製起点である。このような配列のもう1つの例は、(宿主細胞が哺乳動物細胞の場合は) SV40 複製起点である。宿主細胞が酵母細胞の場合、ベクターが複製できるようにする適切な配列は、酵母プラスミド 2 μ 複製遺伝子 REP1-3 および複製起点である。

## 【0056】

ベクターはまた、選択マーカー、例えば、ジヒドロフォレートレダクターゼ (DHFR) をコードする遺伝子や、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシンまたはハイグロマイシン等の薬に対する抵抗性を付与する遺伝子、のような、宿主細胞中の欠陥を補う産物をコードする遺伝子を含んでもよい。

## 【0057】

原核または真核細胞での発現に適した多数のベクターはこの分野で知られており、それらのいくつかは市販されている。適したいくつかの市販の哺乳動物発現ベクターには、pMC1neo (ストラタジーン)、pXT1 (ストラタジーン)、pSG5 (ストラタジーン)、pcDNAI (インビトロジェン)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37593)、pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pSV2-dhfr (ATCC 37146) が含まれるが、これらには限定されない。

## 【0058】

第6の見地として、本発明は、核酸構築物または組み換えベクターを導入した宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は原核または真核のものであり、これらには、バクテリア、酵母および糸状菌等の真菌細胞、ヒト、ウシ、ブタ、サルおよびげっ歯類起源の細胞系等の哺乳動物細胞、キロシヨウジョウバエ誘導細胞系等の昆虫細胞、等が含まれるが、これらには限定されない。

## 【0059】

適切な宿主細胞の選択は、この分野で認識される多数の要因に依存することとなる。これらには、例えば、選択されたベクターとの適合性、(副)産生物の毒性、望むタンパク質またはポリペプチドの回収の容易性、発現の特徴、生物学的安全性および費用が含まれる。

## 【0060】

適切な原核細胞の例は、Bacillus subtilis、Bacillus licheniformis、Bacillus brevis、Streptomyces lividans 等のようなグラム陽性バクテリア、または E. coli のようなグラム陰性バクテリアである。

## 【0061】

酵母宿主細胞は、例えば、Saccharomyces cerevisiae 等の Sa

c c h a r o m y c e s または S c h i z o s a c c h a r o m y c e の種から選んでもよい。有用な糸状菌は、例えば、A s p e r g i l l u s o r y z a e または A s p e r g i l l u s n i g e 等の A s p e r g i l l u s 種から選んでもよい。

【0062】

適切であり、市販されている哺乳動物種由来の細胞系には、C O S - 1 ( A T C C C R L 1 6 5 0 ) C O S - 7 ( A T C C C R L 1 6 5 1 )、C H O - K 1 ( A T C C C C L 6 1 )、3 T 3 ( A T C C L 9 2 )、N I H / 3 T 3 ( A T C C C R L 1 6 5 8 )、H e L a ( A T C C L 2 )、および M R C - 5 ( A T C C C C L 1 7 1 ) が含まれるが、これらには限定されない。

【0063】

組み換えベクターは、限定されないがトランスフォーメーション、トランスフェクション、プロトプラスト融合、およびエレクトロポレーション等の多数の技術のいずれか1つに従い宿主細胞に導入してもよい。

【0064】

そして、組み換え宿主細胞は、目的とするタンパク質の発現が起こるような条件下で適切な栄養培地中で培養される。細胞を培養するために用いられる培地は、ミネラルや適切な補給物を含む複合培地のような宿主細胞の成長に適したいずれの通常の培地でもよい。適切な培地は、市販の販売者から入手でき、または公開されている処方（例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクションのカタログにある）に従い、調製してもよい。

【0065】

非相同性ポリペプチドを発現している宿主細胞クローンの同定は、限定されないが特異的抗体による免疫学的反応性等のいくつかの手段により行ってもよい。

【0066】

第7の見地として、本発明は、細胞の分裂および増殖に機能的に関与するポリペプチドまたはそれらのフラグメントを宿主細胞で産生する以下の工程を含む方法に関連する：

( i ) ( a ) から ( d ) で規定された操作可能に結合された核酸分子を有する発現ベクターを適切な宿主細胞に移入すること、および

( i i ) 前記ポリペプチドまたはそれらのフラグメントの発現が起こる条件下で工程 ( i ) の宿主細胞を培養すること、および

( i i i ) 任意に、発現したポリペプチドを培地に分泌させること。

【0067】

第8の見地として、本発明は、以下からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含む、細胞の分裂および増殖に機能的に関与するポリペプチドまたはそれらのフラグメントを含む：

( a ) 配列番号 8、9、10、11 および 13 で表されるアミノ酸配列およびそれらのフラグメント、

( b ) ( a ) の配列の 100 残基以上の少なくとも 25 %、好ましくは 100 残基以上の少なくとも 30 %、より好ましくは 100 残基以上の少なくとも 35 %、最も好ましくは 100 残基以上の少なくとも 40 % と配列同一性を示すアミノ酸配列、および / または、最大  $10^{-3.0}$  の e 値、好ましくは最大  $10^{-3.5}$  の e 値、最も好ましくは最大  $10^{-4.0}$  の e 値によりブラスト配列分析プログラムを用いたコンピューター検索により検出可能なアミノ酸配列、

( c ) ( a ) 若しくは ( b ) の核酸配列にハイブリダイズできる核酸分子によりエンコードされた、または ( a ) 若しくは ( b ) で規定された配列のいずれかについての遺伝子コードの結果として縮退した核酸分子によりエンコードされた、アミノ酸配列。

【0068】

非相同性ポリペプチドは、目的とするポリペプチドまたはそれらのフラグメントの N - 末端または C - 末端に他のポリペプチドが融合する融合ポリペプチドでもよい。融合したポリペプチドは、他のポリペプチドをエンコードする核酸配列（またはそれらの部分）を本発明の核酸配列（またはそれらの部分）に融合させることにより製造される。融合ポリペプチドを製造する技術はこの分野で知られており、それらがフレーム中にあり、融合ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドの発現が同じプロモーターおよびターミネーターの制御下にあるように、コード配列を結合することを含む。

【0069】

目的とするポリペプチドの発現は、*in vitro*で製造された合成mRNAを用いて行ってもよい。合成mRNAは、限定されないがコムギ胚芽抽出物および網状赤血球抽出物等の種々の細胞を含まない系で効果的に翻訳でき、また、限定されないがカエル卵母細胞、好ましくは*Xenopus*卵母細胞へのマイクロインジェクション等の細胞に基づいた系でも効果的に翻訳できる。

【0070】

第9の見地として、本発明は、上記に同定されたポリペプチドに対する、およびそれらの免疫学的フラグメントに対する抗体に関連する。ここで用いられる「抗体」の用語には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の双方、並びに、抗原またはハプテンに結合できるFv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>フラグメントのような、それらのフラグメントが含まれる。本発明はまた、望む抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列をヒトアクセプター抗体の配列と組み合わせた「ヒト化」ハイブリッド抗体も企図する。ドナー配列は、通常少なくともドナーの抗原結合アミノ酸残基を含むが、他の構造的および/または機能的に等価なドナー抗体のアミノ酸残基を同様に含んでもよい。このようなハイブリッドは、この分野でよく知られたいくつかの方法により調製できる（例えば、WO 89/09622； WO 94/11509； Couto, Hybridoma 13 (1994), 215-219； Presta, Cancer Research 57 (1997), 4593-4599を参照のこと）。本発明の抗体は、対応する免疫学的（ポリ）ペプチドのアフィニティー精製のための使用、抗イデオタイプ抗体の調製のための使用、また、例えば診断や薬のスクリーニングアッセイ等の種々のアッセイにおける特異的結合剤としての使用、または上記で例示したような異常および/または過剰な細胞の分裂または増殖に関連した疾患の治療のための方法等の、幅広い有益な応用を有することとなる。特に、前記抗体または適切なそれらのフラグメント、特にヒト化形態のものは、上記に例示したような異常および/または過剰な細胞の分裂または増殖に関連した癌および他の疾患を処置するための方法における治療剤として用いてもよい。また、抗体は、上記に同定されたポリペプチドの最も特徴的な部分として製造され、結果として、他の起源並びに上記に同定されたポリペプチドの変異体および誘導体からの構造的および/または機能的に関連したポリペプチドを同定するために用いてもよい。

【0071】

本発明のポリペプチドに対する抗体を製造するために、無傷のポリペプチドまたはそれらの免疫学的フラグメントのいずれかを免疫原として用い、上述したような適切な宿主細胞で、または標準的なペプチド合成技術を用いて製造される。

【0072】

ポリクローナル抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等のような動物を、免疫アジュバントを用いるか用いないかのいずれかで、適切な濃度の目的とするポリペプチドまたはそれらのフラグメントにより免疫することにより製造される。

【0073】

許容される免疫アジュバントには、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、ミョウバン沈殿物、*Corynebacterium parvum*およびtRNAを含む油中水エマルジョンが含まれるが、これらには限定されない。

【0074】

典型的な免疫プロトコルとして、各々の動物は、最初の免疫において、皮下（SC）、腹腔内（IP）、皮内またはこれらのいずれもの組み合わせのどれかにより、複数の部位に約0.1μgから約1000μgの免疫原を受ける。動物は、最初の注射に続いて追加注射を受けても受けなくてもよい。追加注射を受けた動物は、一般的にフロイント不完全アジュバントと同量の免疫原を、同じ経路で最高の力価が得られるまで約3または4週間の間隔で与えられる。各々の追加免疫の約7-14日後に、または単回の免疫の約1週間後

10

20

30

40

50

に、動物を出血させ、血清を集め、部分標本を約 - 20 で保存する。

【0075】

目的とするポリペプチドまたはペプチドフラグメントと反応するモノクローナル抗体は、基本的に Kohler および Milstein, Nature 256: 495 - 497 (1975) の技術を用いて調製される。まず、例えば Balb/c マウス等の動物を、上述したものと同様のプロトコルを用いて免疫する。抗体陽性動物、好ましくは脾臓細胞からのリンパ球を、この分野で知られてた標準的な工程により免疫された動物から脾臓を除去することにより得る。ハイブリドーマ細胞は、脾臓細胞を、適切な融合パートナー、好ましくはミエローマ細胞と、安定なハイブリドーマの形成ができるような条件下で、混合することにより作成される。融合パートナーには、マウスミエローマ P3/N3 1/A g 4 - 1; MPC - 11; S - 194 および Sp2/0 が含まれるが、これらには限定されない。融合したハイブリドーマ細胞は、選択培地中で成長させることにより選択され、抗体産生によりスクリーニングされる。陽性ハイブリドーマを成長させ、例えば、腹水生成のためにプリスタンでプライム化された Balb/c マウス中に注射する。腹水は、細胞移入の約 1 - 2 週間後に集められ、モノクローナル抗体は、この分野で知られた技術により精製される。代わりに、モノクローナル抗体 (mAb) の *in vitro* の製造が、例えば、子ウシ胎児血清とともに DMEM 等の適切な培地中でハイブリドーマを培養し、この分野で知られた技術により mAb を回収することにより可能である。

10

【0076】

そして回収された抗体は、この目的のために確立されたリンカー技術を用いて、放射性ラベル、酵素ラベル、発光ラベル、蛍光ラベル等のような検出可能なラベルに共有結合されることができる。

20

【0077】

腹水またはハイブリドーマ培養液の抗体力価は、限定されないが、沈殿、受動凝集、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) 技術および放射性免疫アッセイ技術を含む種々の血清学的または免疫学的アッセイにより測定される。同様のアッセイを用いて、体液または組織および細胞抽出物中の上記に同定されたポリペプチドまたはそれらのフラグメントの存在を検出してもよい。

【0078】

この応用において言及した種々のアッセイを実行するためのアッセイキットは、適切に単離された核酸または上記に同定された遺伝子または遺伝子産物のアミノ酸配列で、ラベル化されてるものまたはラベル化されていないもの、および/またはそれらに対する特異的リガンド (例えば抗体) および適切なこの分野で知られた補助的試薬を含んでもよい。アッセイは、液相アッセイまたは固相アッセイ (即ち、担体に固定化された 1 またはそれ以上の試薬を有する) でもよい。

30

【0079】

他に特定される以外は、核酸およびポリペプチド/タンパク質の操作は、分子生物学および免疫学の標準的な方法を用いて実行できる (例えば、Maniatis et al. (1989), 分子クローニング: 実験室マニュアル, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (eds.) 「分子生物学の最新プロトコル」, John Wiley and Sons, 1995; Tijssen, P., 酵素イムノアッセイの実際と理論, Elsevier Press, Amsterdam, Oxford, New York, 1985 を参照のこと)。

40

【0080】

本発明は、上記で規定されたポリペプチドまたはそれらのフラグメント、または上記に規定された前記ポリペプチドに対する若しくはそれらの免疫学的フラグメントに対する抗体のいずれかを含むアッセイキットをさらに含む。

【0081】

これらの組み換えポリペプチド若しくはそれらのフラグメント、および、それらのポリペ

50

プチド若しくはそれらの免疫学的フラグメントに対する抗体は、細胞の分裂または増殖を阻害し、刺激しまたはもたらす相互作用薬のスクリーニングアッセイにおける使用、コンピュータモデル、構造モデルまたは薬の結合および効率を評価するための他のモデルを開発するための使用、異常および/または過剰な細胞の分裂または増殖、特に、充実性腫瘍および造血癌の双方等の腫瘍性疾患または冠状動脈再狭窄に関連する疾患の診断または処置のための方法における使用、等の、幅広い有用な応用を有することとなる。例示的な腫瘍性疾患には、腺癌および黒色種のような癌腫；神経芽腫および網膜芽腫のような中胚様腫瘍；肉腫および種々の白血病；およびリンパ腫、が含まれる。特定の対象としては、乳房、卵巣、胃腸管、肝臓、肺、甲状腺、前立腺、脳、脾臓、尿路、および唾液腺の腫瘍がある。またより具体的には、乳房、卵巣、肺、結腸、およびリンパ腫の腫瘍が企図される。

10

#### 【0082】

従って、第10の見地として、本発明は、細胞の分裂または増殖を阻害し、刺激しまたはもたらす相互作用薬のスクリーニングアッセイにおける、上記に規定されたポリペプチド若しくはそれらのフラグメントの、または前記ポリペプチド若しくはそれらの免疫学的フラグメントに対する抗体の、使用を明らかに含む。

#### 【0083】

相互作用薬のこのようなスクリーニングアッセイは、限定されないが、特に以下の工程を含んでもよい：

1. 前記ポリペプチドまたはそれらの適切な誘導体の組み換え発現
2. 組み換えにより発現したポリペプチドまたはその誘導体の、特にアフィニティークロマトグラフィーによる、単離および任意の精製
3. 任意に、前記ポリペプチドまたはその誘導体と相互作用することを試験される化学物質のラベル化、および/または、組み換えにより発現したポリペプチドのラベル化
4. 組み換えにより発現したポリペプチドまたはその誘導体の固相への固定化
5. 相互作用する可能性のあるパートナーまたはそれらの変種の固定化されたポリペプチドまたはその誘導体への結合
6. 任意に、1またはそれ以上の洗浄工程
7. 相互作用の、特にバックグラウンドレベルを超えて固相に結合して留まっているラベルの量をモニターすることによる、検出および/または定量。

20

30

#### 【0084】

工程1は、適切な発現系、特に細胞を含まない翻訳、バクテリアによる発現、または昆虫細胞におけるバキュロウイルスに基づく発現、からの上記に同定されたポリペプチドまたはその誘導体の組み換え発現を含む。

#### 【0085】

工程2は、当業者によく知られている適切な生化学技術を用いた組み換えにより発現した前記ポリペプチドの単離およびそれに続く任意の精製を含む。

#### 【0086】

代わりに、これらのスクリーニングアッセイは、融合タンパク質または修飾タンパク質、特にGST融合タンパク質またはいわゆる「タグ」配列を携えるタンパク質としての前記ポリペプチドの発現を含む上記に同定されたポリペプチド誘導体の発現を含んでもよい。これらの「タグ」配列は、「フレーム内で」前記標的遺伝子のコード領域のN-またはC-末端のいずれかに結紮される短いヌクレオチド配列からなる。組み換えにより発現した遺伝子をラベル化するために用いられる最も一般的なタグの1つは、ヒスチジンのみからなるホモポリペプチドをエンコードするポリ-ヒスチジン-タグである。この文脈において「ポリペプチド」の用語は、単に配列番号1から7の核酸配列によるポリペプチド、それらの自然発生する相同体、好ましくはオルトログ、より好ましくはヒトオルトログ、特にRP42遺伝子(配列番号12)のみではなく、これらのポリペプチドの誘導体、特に融合タンパク質またはタグ配列を含むポリペプチドも含む。

40

#### 【0087】

50



これらのポリペプチド、特に適切なタグ配列（例えばH i s - タグ）またはG S Tによりラベル化されたものは、標準的なアフィニティークロマトグラフィーのプロトコル、特にいずれも市販の抗 - H i s - タグ - 抗体または抗 - G S T - 抗体に結合したクロマトグラフィー樹脂を用いて、精製してもよい。抗 - タグ - 抗体若しくは抗 - G S T - 抗体または他の「ラベル化特異的」抗体の使用の代わりに、精製は、前記ポリペプチドに対する抗体の使用を伴ってもよい。上述した組み換えにより発現した標的遺伝子の精製工程（工程2）を伴うスクリーニングアッセイは、本発明のこの見地の好ましい態様である。

#### 【0088】

第3の、任意の、工程において、相互作用を試験される物質は、放射性同位体の取り込み、または発光若しくは蛍光物質との反応によりラベル化してもよい。代わりに、またはさらに、組み換えにより発現したポリペプチドをラベル化してもよい。

#### 【0089】

第4の工程において、組み換えにより発現したポリペプチドは、固相、特に（限定されないが）クロマトグラフィー樹脂に固定化される。固相への結合は、それ故好ましくは共有結合を生じさせることにより行われる。

#### 【0090】

第5の工程において、前記組み換えポリペプチドまたはそれらの複合化した変種（特にドラッグライブラリー）の可能性のある相互作用するパートナーであり得る候補化学物質が、固定化されたポリペプチドと接触させられる。

#### 【0091】

第6の、任意の工程において、1またはいくつかの洗浄工程を行ってもよい。結果として、固定化されたポリペプチドと強く相互作用するその物質が、固（固定化）相に結合したまま留まる。

#### 【0092】

第7の工程において、ポリペプチドと特異的物質との相互作用が、特にバックグラウンドレベルを超えて固相に結合して留まっているラベルの量をモニターすることにより、検出される。

#### 【0093】

（配列プロトコルの説明）

配列番号1は、C . e l e g a n s 遺伝子H 3 8 K 2 2 . 2のアイソフォームaおよびb 30  
双方に共通するスプライシングされていないDNA配列を示す（3104bp）。

配列番号2は、C . e l e g a n s 遺伝子H 3 8 K 2 2 . 2aアイソフォームのスプライシングされたDNA配列を示す（1011bp）。

配列番号3は、C . e l e g a n s 遺伝子H 3 8 K 2 2 . 2bアイソフォームのスプライシングされたDNA配列を示す（852bp）。

配列番号4は、C . e l e g a n s 遺伝子C 0 2 F 5 . 1のスプライシングされていないDNA配列を示す（3308bp）。

配列番号5は、C . e l e g a n s 遺伝子C 0 2 F 5 . 1のスプライシングされたDNA配列を示す（3033bp）。

配列番号6は、C . e l e g a n s 遺伝子F 1 0 E 9 . 8のスプライシングされていないDNA配列を示す（7097bp）。 40

配列番号7は、C . e l e g a n s 遺伝子F 1 0 E 9 . 8のスプライシングされたDNA配列を示す（3624bp）。

配列番号8は、C . e l e g a n s 遺伝子H 3 8 K 2 2 . 2aアイソフォームの推定アミノ酸配列を示す（336aa）。

配列番号9は、C . e l e g a n s 遺伝子H 3 8 K 2 2 . 2bアイソフォームの推定アミノ酸配列を示す（283aa）。

配列番号10は、C . e l e g a n s 遺伝子C 0 2 F 5 . 1の推定アミノ酸配列を示す（1010aa）。

配列番号11は、C . e l e g a n s 遺伝子F 1 0 E 9 . 8の推定アミノ酸配列を示す（ 50

1207aa)。

配列番号12は、H38K22.2のヒトオルトログのcDNA配列を示す(780bp)。

配列番号13は、H38K22.2のヒトオルトログの推定アミノ酸配列を示す(260bp)。

【0094】

以下の実施例は、本発明を例示するものであり、本発明を限定するためのものではない。

【実施例1】

【0095】

(RNAi実験のためのdsRNA分子の作成)

まず、オリゴヌクレオチドプライマーペア配列を、標準的なPCR技術を用いて目的とするコード領域の遺伝子部分を増幅するために選択した。プライマーペアは、コード配列の少なくとも500塩基、または500塩基以下の遺伝子に対するコード塩基の最大を含むPCR産物を得るように選択された。in vitroでの双方のDNA鎖からのRNA転写反応のためのテンプレートとしてのPCR産物のその後の使用ができるように、T7ポリメラーゼプロモーター配列「TAATACGACTCACTAAGG」を、フォワードプライマーの5'末端に加え、T3ポリメラーゼプロモーター配列「AATTAACCCCTCACTAAAGG」を、リバースプライマーの5'末端に加えた。オリゴヌクレオチドプライマーの合成は、市販の供給者(シグマ-ジェノシス、イギリス、またはMWG-バイオテック、ドイツ)により行った。

10

20

【0096】

PCR反応は、0.8μMのプライマーと約0.1μgの野生型(N2株)ゲノムDNAテンプレートを用いたTaqポリメラーゼにより、50μlの容積にて行った。PCR産物は、EtOHで沈殿させ、70%EtOHで洗浄し、7.0μlのTEに再懸濁させた。1.0μlのPCR産物を、T3およびT7RNAポリメラーゼを用いた5μlの転写反応のために2つの新しい試験管に各々分注した。個別のT3およびT7転写反応を、製造者(アンピオン、メガスク립トキット)の指示に従い実行し、各々をRNaseを含まない水で50μlに希釈し、そして一緒にした。混合したRNAを、RNeasyキットを用いて、製造者(キアゲン)の指示に従い精製し、RNaseを含まない全量130μlのH<sub>2</sub>O中に溶出させた。この50μlを10μlの6×注射バッファー(40mMのKPO<sub>4</sub>、pH7.5、6mMのクエン酸カリウム、pH7.5、4%のPEG6000)と混合した。RNAを68℃で10分間アニールし、37℃で30分間保持した。最終dsRNAの濃度は、0.1-0.3μg/μlの範囲で測定された。PCR反応、T3およびT7転写反応の産物およびdsRNA種を、1%アガロースゲルに流し、品質管理の目的で試験した。2本鎖の完成は、非変性ゲルに流したときの、1本鎖RNAに応じたゲル移動性の変位を評点化することにより評価した。

30

【実施例2】

【0097】

(dsRNAの注射および表現型のアッセイ)

dsRNAを野生型(N2株)の若い成虫の雌雄同体個体の両方の生殖腺の対向部分に左右対称に注射し、動物を20℃で24時間インキュベートした。そして、注射した動物から胚を解剖し、経時的示差干渉コントラストビデオ顕微鏡により細胞分裂工程における可能性のある欠陥を分析し、前述したように5秒ごとに1つの画像を捉えた(Gonczy et al., 「変異分析による細胞1個の状態のCaenorhabditis elegans胚における細胞分裂工程の解剖」J Cell Biol 144, 927-946 (1999))。各々の実験では、少なくとも3つの異なる注射された虫からの胚を、細胞4個の段階まで受精後すぐから、この方法により撮影した。2つのさらなる注射された虫からの胚を、静止画像によっても記録し、それゆえ各々の実験において少なくとも5つの注射された虫の表現型の記録を得た。

40

【0098】

50

いくつかの場合において、注射された動物の解剖の間の構造的な強固さの損失により明白となったような、胚は浸透圧の変化に対して鋭い感受性を示した。この制限を克服するため、注射された動物を解剖せず、むしろ、0.1%トリカインおよび0.01%テトラミソールを含むM9溶媒で10分間麻酔し、無傷のままアガロースパッドにのせ、胎内でF1胚形成を観察した(Kirby et al., Dev. Biol. 142, 203-215 (1990))。体壁を通じて見ることにより達成された解像度は、解剖された胚を観察することにより達成されたものとは同じではなく、これらの場合限定された表現型の分析のみ行った。

#### 【0099】

3つの注射された動物を、dsRNAの注射の24時間後に新しいプレートに移し、20で放置した。2日後、プレートステレオ顕微鏡を用いて(20-40×全倍率)F1幼虫(L2's-L4's)の存在、およびそれらの発育段階について確認した。その2日後、プレートF1成虫の存在、並びにそれらの身体全体の形態およびF2後代の存在について検査した。

#### 【実施例3】

#### 【0100】

(C. elegans 遺伝子H38K22.2の特徴付け)

2つのdsRNA、「300C3」および「340G12」を設計し、これを用いてRNAiによるC. elegans 遺伝子H38K22.2の発現を特異的に沈黙化し、これにより、この後生動物種における胚細胞分裂の最初の2期に対するその機能的な関与を調べた。dsRNAをH38K22.2遺伝子のPCR増幅した野生型ゲノムDNAフラグメントからin vitroで合成した。PCRにおいて、2組のプライマー対を用いた:「TCAATCAGTATGTCGACCC」と「GGAAAGAAATTTGGGGAACAA」を、それぞれフォワードおよびリバースプライマーとしてdsRNA「300C3」を作成するために、そして、「ATCGAGCGCCTCTTCAATC」と「TGGTGTCCTCCATTGCTGA」を、それぞれフォワードおよびリバースプライマーとしてdsRNA「340G12」を作成するために用いた。dsRNAを精製し、成虫の雌雄同体虫に注射した。RNAi処理による表現型の結果を、経時的示差干渉コントラスト(DIC)顕微鏡を用いて、注射した虫のF1後代において24時間後に記録した。胚の記録は受精後~20分に始め、雌性前核がその減数分裂を完成させている間に、~30分後に、細胞4個の段階まで行った。

#### 【0101】

注射されていないかまたは無関係のdsRNAを注射したかのいずれかの対照虫のF1後代において、DIC顕微鏡による観察により、胚細胞分裂の最初の2期の細胞事象が極めて限定された変異性しか示さないことがわかった。表現型の異常の可能性について試験され、評価付けされたすべての工程を、図1に並べて例示する。要約すると、胚の前後の極性を、卵子への進入の直後の(図1aの右の矢印)、皮質における雄生前核の位置により最初に決定した。これは、胚の長軸に沿って雄性前核に向かう細胞質の中央部分を通じた明確で統制された卵黄顆粒の流れ、および胚の前方に進行する共同性の一連の皮質の波若しくはさざ波(図1の左側)、を伴う。その後直ぐに、雄性および雌性前核は、高度にパターン化された移動を受け(図1a、bのそれぞれ右および左の矢印)、胚の後半でそれらが接触することとなり(図1c)、その後前核対の中心化と回転(図1d)が起こり、胚の長軸に沿って将来の紡錘体を構成するための連結した中心体となる(図1b-dの矢尻)。前核膜の同期した崩壊の後、明確に二極化した紡錘体は最初は短い(図1e)、後部極の明確な横方向の「揺れ」運動を示す間に伸びる(図1f-h)。これらの運動は、後部極の紡錘体のわずかな後部の置換を伴う一方、前部の紡錘体極はほぼ静止して留まる。そして、これは、後期および終期の間に紡錘体の非対称な位置決めをもたらし、それにより細胞質分裂溝の非対称な配置を生じ(図1i、jの矢尻)、大きさの異なる娘細胞が生じ、小さい後部P1卵割球(図1k-oの右の細胞)、および大きな前部AB卵割球(図1k-nの左の細胞)となる。そしてAB核がAB細胞の中心に直接移動する一方(

図 1 k - l の左の矢印)、その複製された中心体の誘導の 1 つにより前部 P 1 皮質に再移動する間の明確な 90° の回転を受ける前に (図 1 m の矢尻)、P 1 核は一般的にその細胞の後部にさらに移動する (図 1 k - l の右の矢印)。これは、P 1 卵割球が胚の長軸に沿って、A B 卵割球のものに対して垂直に、分割することを保証する (図 1 n の矢尻は中心体を示す)。これらの 2 つの分裂は非同期的に起こり、P 1 は A B に 2 - 3 分遅れる (図 1 n - p)。

#### 【0102】

d s R N A 「300C3」または「340G12」を注射された虫の F 1 胚において、以下の高い再現性を有する表現型が観察される (図 2)。まず、雌性前核の移動の力学はすべての場合で正常に見えるが、その開始はしばしば幾分遅い。2 つの前核の接触および付着は、雌性前核が雄性前核に連結した 2 つの中心体の内の 1 つによってしか捉えられないという欠陥も一般的に示した (図 2 a - c を図 1 a - c と比較)。この欠陥は前核膜の崩壊が完了する前に通常修正されるが、これに続く胚内での紡錘体の位置決めもしばしば欠陥があるように見える。この表現型の弱い発現は、後期の間の後部紡錘体極の揺れを欠くように見え、一方より重篤な場合は、後部または横の皮質へ向けた全紡錘体の顕著な変動を示し、皮質そのものに到達しその長軸方向の配置が完全に失われる。後者の場合、極度に異常な紡錘体の位置は、切断溝形成の不適切な特異性を発生させ、異常な細胞質分裂を導く。紡錘体の位置が相対的に正常に見える場合でも、娘の核中心体複合体 (N C C) の位置が、後期の終了および切断溝の進入後直ぐに一般的に異常に見えるようになる。これは、しばしば特に A B 卵割球において見られ、ここでは N C C が、終期の開始において細胞の中心に向けて直接移動する代わりに、結局中心に行く前に横の皮質の極近傍の前部にまず移動する (図 2 a - k)。この欠陥は、終期において領域間の紡錘体微小管の明らかな欠損および細胞質分裂の切断溝の顕著な二股または分岐を通常伴い (図 2 g の矢印)、異常な大きさの娘卵割球または溝の完全な進入による細胞質分裂の不全さえも導く (図 2 g - m)。核の移動および P 1 核の位置決めも、ほとんどの場合異常があり、その予期された 90° の回転および前部皮質との連結の達成を顕著に遅らせ、またはいくつかの場合は完全に不全にする結果となる。P 1 卵割球の分裂は、このような胚でしばしば顕著に遅れる。最後に、複数の雌性前核の存在により証明されるように、雌性減数分裂の欠陥が時折観察され、1 または両方の極性体をうまく押し出すのに失敗したことを示し、これは上記に示したものと同様の細胞質分裂の欠陥から生じるものであろう。

#### 【0103】

観察されたすべての表現型は、有糸分裂の間、おそらく減数分裂の間も、N C C および紡錘体の微小管に依存する細胞の位置決めにおいて、H 3 8 K 2 2 . 2 遺伝子の機能を必要とすることを示している。この機能は後生動物全体を通じて細胞終期の進行および細胞分裂に不可欠なものであるので、この遺伝子、いずれかの相同体、およびそれらの誘導体は、抗増殖剤等の幅広い治療の開発に用いる優秀な道具であることを示す。H 3 8 K 2 2 . 2 遺伝子配列の分析により、ヒト (N C B I アクセッション番号 # A A H 0 9 4 7 8)、マウス (N C B I アクセッション番号 # A A F 0 4 8 6 3) およびキイロショウジョウバエ (N C B I アクセッション番号 # C G 7 4 2 7) における明確なオルトログが見出され (図 5 参照)、これらのすべてが現在までのところそれらに起因したいずれの機能も知られていなかった。タンパク質レベルにおける配列保存の非常に高いレベルに基づき、これらの遺伝子のすべてがそれらのそれぞれの種において等価の機能を有するタンパク質をおそらくエンコードすると結論づけることができる。H 3 8 K 2 2 . 2 遺伝子アイソフォーム「a」によりエンコードされた 336 残基のタンパク質は、S M A R T または C C D 分析のいずれかにより、知られていない構造モチーフまたはコンセンサスドメインを示す。

#### 【実施例 4】

#### 【0104】

(C . e l e g a n s 遺伝子 C 0 2 F 5 . 1 の特徴付け)

d s R N A、「307C1」を設計し、これを用いて R N A i による C . e l e g a n s 遺伝子 C 0 2 F 5 . 1 の発現を特異的に沈黙化し、これにより、この後生動物種における

10

20

30

40

50

胚細胞分裂の最初の2期に対するその機能的な関与を調べた。dsRNAをC02F5.1遺伝子のPCR増幅した野生型ゲノムDNAフラグメントから*in vitro*で合成した。PCRにおいて、配列「ATCTGAAGATCCGTCCTCACT」と「ATGCAACAATGGGTATTTT」を有するオリゴヌクレオチドを、それぞれフォワードおよびリバースプライマーとして用い、精製したdsRNA「307C1」を作成し、成虫の雌雄同体虫に注射した。RNAi処理による表現型の結果を、経時的示差干渉コントラスト(DIC)顕微鏡を用いて、注射した虫のF1後代において24時間後に記録した。胚の記録は受精後～20分に始め、雌性前核がその減数分裂を完成させている間に、細胞4個の段階まで、～30分後まで行った。

#### 【0105】

注射されていないかまたは無関係のdsRNAを注射したかのいずれかの対照虫のF1後代において、DIC顕微鏡による観察により、胚細胞分裂の最初の2期の細胞事象が極めて限定された変異性しか示さないことがわかった。表現型の異常の可能性について試験され、評価付けされたすべての工程を、図1に並べて例示する。

#### 【0106】

dsRNA「307C1」を注射された親虫からのF1胚は、一致して次の表現型を示すことが見出される(図3)。まず、有糸分裂に入るまでDIC顕微鏡により評価化できるすべての細胞工程は、一般的に野生型のパターンから区別できない。これらには、卵子の形状および大きさ、卵黄顆粒の大きさおよび密度、卵黄顆粒の流れおよび皮質のさざ波、疑似切断溝の形成および位置決め、前核の出現(図3aの矢印)および移動(図3a、b)、また、前核の中心化および回転(図3b、c)、並びに中心体の連結した対(図3b、cの矢尻)、が含まれる。両極の紡錘体の形成および位置決めも正常に起こるが、紡錘体は野生型よりも最もしばしば薄く強固さが少なく、後期でのその揺れおよび伸長の間横に曲がる異常を示す(図3f-i)。細胞質分裂の完了後、正常に見えるものは、再形成された娘核が一般的に涙型であり、延長された期間新しく形成した皮質の近くに留まる(図3aおよびk)。涙の形状と一致して、2つの核はしばしば異常なクロマチン架橋により物理的に接合したまま留まり、核片体も一般的に見られる(図3kおよびlのアスタリスク)。この表現型は、これに続いてすべての場合において胚の致死をもたらした。

#### 【0107】

前核の移動および両極の紡錘体の組立における欠陥の不存在は、より一般的な微小管の機能におけるこの遺伝子の役割に対して議論となる。観察された欠陥は、有糸分裂の染色体分離の、おそらく姉妹染色分体の分離の不全と一致し、クロマチン架橋の形成をもたらした。終期においてもそのままである。したがって、このデータは、有糸分裂の染色体分離におけるC02F5.1遺伝子の機能に不可欠なものを示す。この機能は後生動物全体にわたり細胞終期の進行および細胞分裂に不可欠なものである。この遺伝子、いずれかの相同体、およびそれらの誘導体は、抗増殖剤等の幅広い治療の開発に用いる優秀な道具であることを示す。

#### 【0108】

C02F5.1配列の分析により、エンコードされた1010残基のタンパク質が、ラセンに巻いたラセン構造、即ちタンパク質-タンパク質相互作用ドメインのような構造、を形成すると予期される領域を含むことが明らかとなる。ブラストプログラムを用いた配列相同性分析は、現在のところ他の生物における明確なオルトログ配列を明らかにしていない。しかし、問題となる細胞工程の基本的および高く保存された性質を考慮すると、この遺伝子/タンパク質の機能的オルトログは、すべての後生動物、おそらくすべての真核生物に存在すると強く考えられ、例えば実施例6に概説した方法論を用いて同定されることとなる。

#### 【実施例5】

#### 【0109】

(C. elegans 遺伝子F10E9.8の特徴付け)

2つのdsRNA、「305A12」および「341G5」を設計し、これを用いてRN

10

20

30

40

50

Aiによる*C. elegans*遺伝子F10E9.8の発現を特異的に沈黙化し、これにより、この後生動物種における胚細胞分裂の最初の2期に対するその機能的な関与を調べた。dsRNAをF10E9.8遺伝子のPCR増幅した野生型ゲノムDNAフラグメントから*in vitro*で合成した。PCRにおいて、2組のプライマー対を用いた：「TTCGTCCTCGAACACGTAATATCCT」と「GAAAGAAAGATGAATCAGGCATTG」を、それぞれフォワードおよびリバースプライマーとしてdsRNA「305A12」を作成するために、そして、「CTGCAGAAATTAATGACTGTGTCG」と「AGCATTCAGATTGTGTTGTCC」を、それぞれフォワードおよびリバースプライマーとしてdsRNA「341G5」を作成するために用いた。dsRNAを精製し、成虫の雌雄同体虫に注射した。RNAi処理による表現型の結果を、経時的示差干渉コントラスト(DIC)顕微鏡を用いて、注射した虫のF1後代において24時間後に記録した。胚の記録は受精後~20分に始め、雌性前核がその減数分裂を完成させている間に、細胞4個の段階まで、~30分後まで行った。

10

#### 【0110】

注射されていないかまたは無関係のdsRNAを注射したかのいずれかの対照虫のF1後代において、DIC顕微鏡による観察により、胚細胞分裂の最初の2期の細胞事象が極めて限定された変異性しか示さないことがわかった。表現型の異常の可能性について試験され、評点付けされたすべての工程を、図1に並べて例示する。

#### 【0111】

dsRNA「305A12」または「341G5」を注射された虫のF1胚において、以下の高い再現性を有する表現型が観察される(図4)。まず、細胞2個の段階までのDIC顕微鏡により評点化できるすべての細胞工程は、一般的に野生型のパターンから区別できない。これらには、卵子の形状および大きさ、卵黄顆粒の大きさおよび密度、卵黄顆粒の流れおよび皮質のさざ波、疑似切断溝の形成および位置決め、前核の出現(図4aの矢印)および移動(図4a、b)、また、前核の中心化および回転(図4b、c)、並びに中心体の連結した対(図4b、cの矢尻)、が含まれる。分裂の第1期は、野生型から検出可能ないずれの異常も有さずに起こる(図4d-h)。単一の細胞胚における中心体若しくは紡錘体極の大きさ、数または位置決めに関係する欠陥が観察されないということは、特筆すべきである(図4b-fの矢尻)。しかし、細胞2個の段階の胚において、核の位置決めは野生型と同等に留まっているが、中心体分裂の明らかな不全が2つの卵割球のうちの1つおよび時にはその両方において一致して観察される。単一の核周囲の中心体領域は、その卵黄顆粒の排除により見られ(図4h-jの黒矢尻)、これは野生型胚および影響を受けていない卵割球の両方において通常見られる2つのものの代わりに観察される(図4i、jの白矢尻)。中心体の分裂の明白な不全にもかかわらず、微小管に依存した工程は正常に持続し、その単一の中心体領域の誘導により、P1核の成功した前部の移動により例示される(図4h-jの黒矢尻)。有糸分裂に入ると、核膜の崩壊により評点化されるように、欠陥ある卵割球が両極の紡錘体を生じさせるのに失敗し、その領域における卵黄顆粒の放射状配置により証明されるように、その代わりに微小管の単極アレイを形成する(図4kの点線の円)。その卵割球において細胞質分裂に失敗し、核片体として知られる、複数の不規則な大きさの核の再形成をもたらす(図4m、nの矢印)。対照的に、細胞分裂のすべての見地が近くの卵割球において正常に起こり、正常な娘細胞をもたらす、各々は単一の同じ大きさの核を含む(図4lの矢印)。

20

30

40

#### 【0112】

両極の紡錘体の形成の完全な不全は、影響を受けた細胞2個の段階の卵割球における2つのものの代わりに単一の中心体領域の存在を伴い、紡錘体の組立の複合工程においてF10E9.8遺伝子の機能を必要とすることを明らかに示す。しかし、細胞1個の胚における前核の移動と紡錘体の機能を含む他の微小管に依存する工程の検出可能な欠陥を欠くことは、一般的な微小管に関連する機能を効果的に除外する。RNAi効果の母性の性質および卵子がその最初の中心体を父性により受け継ぐという事実を考慮すると、細胞1個の胚における両極の紡錘体の成功した発生は、F10E9.8機能が、事実として、中心体

50

の分裂または分離の何らかの見地のために必要とされうるということをさらに示唆する。

【0113】

実際、精子の成長は、RNAi処理の開始前に親の間に完全に完了するので、これは注射されたdsRNAにより影響されずに留まる。これは、無傷の「野生型」中心体を受精に精子から卵子に与えることとなる。受精の後、このすでに2分割した中心体（即ち、2つの中心小体の存在により証明される、2つの「複製単位」を含む）は、分裂の1期を受け、これは各々存在する中心小体からの新しい中心小体胴の発芽により他の系において観察される。これは、2つの中心小体対と連結する中心小体周囲の物質との分離に続く。この工程は、以前の分裂事象には依存せず、胚細胞分裂の第1期に使用される両極の紡錘体の成功した形成を保証することのみが必要となる。したがって、F10E9.8の機能は、この工程には必要とされないであろうと思われる。

10

【0114】

しかし、第1の分裂期が不全の場合は、両極の紡錘体の形成は、ここで見たように、分裂の第2期の間に不全となると予期される。興味深いことに、この不全が2つの卵割球のうちの1つのみにしばしば起こるという事実は、これらの場合もとの中心体の2つの「複製単位」のうちの1つのみが細胞1個の段階でその分裂の第1期において実際に失敗することを示唆する。この観察は、精子の中心体に含まれる2つの複製単位のうちの1つが実際に、1つの分裂期のためにすでに完全に装備されている卵子に入るが、もう一方がそれ自身の分裂ができるように卵子内の細胞質因子に依存することを示す、他の真核生物からの知見に一致する（Sluder, G., Hinchcliffe E.H. 「中心体再生の制御：正しい時における正しい数」 Biol. Cell. 91, 413-27 (1999)）。

20

【0115】

したがって、この知見は、紡錘体の組立においてF10E9.8の機能に必要とされるものが中心体の分裂工程においてこの遺伝子の基本的な役割からもたらされるであろうことを示唆する。

【0116】

紡錘体の組み立て工程は、後生動物全体を通じて細胞周期の進行および細胞分裂に不可欠なので、この遺伝子、いずれかの相同体、およびそれらの誘導体は、抗増殖剤等の幅広い治療の開発に用いる優秀な道具であることを示す。F10E9.8配列の分析により、エンコードされた1207残基のタンパク質が、ラセンに巻いたラセン構造、即ちタンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、および4つの予期された透過膜ドメインのような構造、を形成すると予期される1つの大きな領域を含むことが明らかとなる。ブラストプログラムを用いた配列相同性分析は、現在のところ他の生物における明確なオルトログ配列を明らかにしていない。しかし、問題となる細胞工程の基本的でおよび高く保存された性質を考慮すると、この遺伝子/タンパク質の機能的オルトログは、すべての後生動物、おそらくすべての真核生物に存在すると強く考えられ、例えば以下の方法論を用いて同定されることとなる。

30

【実施例6】

【0117】

40

（他の種における機能的オルトログを同定するためのプロトコル）

本発明は、モデル生物C. elegansの細胞分裂において基本的な機能を有するものとして同定された遺伝子を記述する。モデル生物における研究を実行するための基礎は、C. elegansの遺伝子について新たに発見された機能がヒトを含む他の種で保存されるであろうということである。細胞分裂は、進化の間に高度に保存され、したがってC. elegansの遺伝子機能を発見し、ヒトオルトログについて機能の特徴付けまたは割り当てることにその情報を用いることによる手法は、非常に正当化される。進化の間の遺伝子の保存には2つの主題がある。遺伝子配列は保存されう。これは、遺伝子のDNAヌクレオチド配列が異なる種において非常に似ており、そして次にこれが遺伝子の機能が異なる種において同じであるということを示唆する。いずれの当業者にも知られている

50

ように、特定のレベル以上の配列同一性または相同性は、異なる種の2つの遺伝子が同じ遺伝子産物および遺伝子機能をコードすることを規定する。相同性の遺伝子は、適切なソフトウェアを用いたブラスト分析の実行や、他の手法により一般的に同定することができる。ブラスト検索では、 $10^{-30}$ のe値により顕著に相同性の配列を抽出できる。さらに、系統発生的分析を行って、抽出されたどの配列がオルトログであるかを同定できる。

#### 【0118】

したがって、オルトログの同定のための以下の例を提示することができる。ブラスト検索をブラスト配列分析プログラムを用いて $10^{-3}$ のe値にて行う。代わりのパラメータとして、配列同一性の割合でもよい。 $100$ 残基以上において、 $30\%$ の配列同一性を相同性の遺伝子と規定する。ブラスト検索の完了後、複数の配列アライメントを適切なソフトウェア（例えば、CLUSTALW）を用いて実行し、近隣を結合した系統学的ツリーを作成する。いずれの当業者も、系統学的ツリーからヒトオルトログを同定できる。本質的に、単一の種分化事象によりツリーにおいて分離している、またはツリーに最も近く関係しているヒトの配列は、オルトログでありうる。

10

#### 【0119】

保存の第2の主題は、遺伝子の機能が配列の大きな多様性により保存できることである。本発明において、この保存の主題は規定されていない。しかし、他の遺伝子が、その遺伝子産物が本発明において請求されているものと同じの遺伝子産物であると同定される結果となる機能を有すると発見される場合は、本請求項はそのような遺伝子に対しても適用される。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0120】

【図1】図1は、野生型*C. elegans*における胚細胞分裂の最初の2期の経時的検査記録から得たDIC顕微鏡画像を示す。

【図2】図2は、遺伝子H38K22.2に対して誘導されたdsRNA「300C3」または「340G12」により処理されたF0親からの*C. elegans*のF1後代における胚細胞分裂の最初の2期の経時的検査記録から得たDIC顕微鏡画像を示す。

【図3】図3は、遺伝子C02F5.1に対して誘導されたdsRNA「307C1」により処理されたF0親からの*C. elegans*のF1後代における胚細胞分裂の最初の2期の経時的検査記録から得たDIC顕微鏡画像を示す。

30

【図4】図4は、遺伝子F10E9.8に対して誘導されたdsRNA「305A12」により処理されたF0親からの*C. elegans*のF1後代における胚細胞分裂の最初の2期の経時的検査記録から得たDIC顕微鏡画像を示す。

【図5】図5は、H38K22.2aファミリーの多重の配列アライメントを示す。ここで、2つの*C. elegans* スプライス変種H38K22.2aおよびH38K22.2bのアミノ酸配列は、キロショウジョウバエ（CG7427）、マウス（AAF04863）および*homo sapiens*（AAH09478）のそれらのオルトログのアミノ酸配列と比較される。「統計値」は、個々の配列間の相同性の程度を特徴づける値として参照され、e値、配列同一性および保存的に変化した残基（陽性）として表される。

40



## 【 図 5 】

H38K22.2a ファミリーの多重配列アライメント

```

CcH38K22.2a  ---MRLLE-DQRTKLCQPCVHVVIVNSDFIAKAMNHTLVNTLVDPNHLFASSTF
CcH38K22.2b  ---MRLLES-DQ-----
DmCG7427      KLLKRLKSTPTSDHVKKIKINHTWCSTAFSCQDNKATDSCDNVAKSSTYTRF--
MmAA04863     ---MRLLES-SQDKVQCFITFGSSECTAISCSQNDKLVQVTFQNTFLYIRESV
HsAA09478     ---MRLLES-SQDKVQCFITFGSSECTAISCSQNDKLVQVTFQNTFLYIRESV

CcH38K22.2a  QPQKSRHREHRIHQVVDKQVVCSEKQSPHSGRLLTDSKATDRATMIRHHTFOT
CcH38K22.2b  ---PQSEHFNQVYRRAVCGDMFVSGRLLTDSKATDRATMIRHHTFOT
DmCG7427      ---LREKNSRQLENNVDSQD---PALSQSGQHLRFLKQDKPKSLKLTATKPSAV
MmAA04863     KGLPKCKAMQVTRKQDQD---ENKIGIQRQCFQDQDLOPASTSYLTATKPSAV
HsAA09478     KGSQKCKAMQVTRKQDQD---ENKIGIQRQCFQDQDLOPASTSYLTATKPSAV

CcH38K22.2a  LQKRSQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV
CcH38K22.2b  DQKPSLDVVVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV
DmCG7427      QSEFSDHINQDQGIHEDKATKPILEQETN-DMKPKDQVHTFYKCPQCKS
MmAA04863     QSEFSDHINQDQGIHEDKATKPILEQETN-DMKPKDQVHTFYKCPQCKS
HsAA09478     QSEFSDHINQDQGIHEDKATKPILEQETN-DMKPKDQVHTFYKCPQCKS

CcH38K22.2a  SGLSTALCONHLPQGRSTMTQIIFMAGENAASRLQVVGASNAQPKSVWISRFQ
CcH38K22.2b  SGLSTALCONHLPQGRSTMTQIIFMAGENAASRLQVVGASNAQPKSVWISRFQ
DmCG7427      SGLSTALCONHLPQGRSTMTQIIFMAGENAASRLQVVGASNAQPKSVWISRFQ
MmAA04863     SGLSTALCONHLPQGRSTMTQIIFMAGENAASRLQVVGASNAQPKSVWISRFQ
HsAA09478     SGLSTALCONHLPQGRSTMTQIIFMAGENAASRLQVVGASNAQPKSVWISRFQ

CcH38K22.2a  VNPVHIFILSKPOLADQCEGAKVFLQGVVYCRENLQYKPKGNASNDQGMETPKTAQ
CcH38K22.2b  VNPVHIFILSKPOLADQCEGAKVFLQGVVYCRENLQYKPKGNASNDQGMETPKTAQ
DmCG7427      VNPVHIFILSKPOLADQCEGAKVFLQGVVYCRENLQYKPKGNASNDQGMETPKTAQ
MmAA04863     VNPVHIFILSKPOLADQCEGAKVFLQGVVYCRENLQYKPKGNASNDQGMETPKTAQ
HsAA09478     VNPVHIFILSKPOLADQCEGAKVFLQGVVYCRENLQYKPKGNASNDQGMETPKTAQ

CcH38K22.2a  KKPKTFYFNSNLQTRFKIQQVMLATIKITIHAGTNR
CcH38K22.2b  KKPKTFYFNSNLQTRFKIQQVMLATIKITIHAGTNR
DmCG7427      SQKILSAYQTSHTNMYG-----
MmAA04863     SQKILSAYQTSHTNMYG-----
HsAA09478     SQKILSAYQTSHTNMYG-----

```

Seq ID	HsAA09478	MmAA04863	DmCG7427
CcH38K22.2a	e 値 : 1e-49 同一性 : 111/275 (38%) 断片性 : 159/275 (56%)	e 値 : 7e-49 同一性 : 109/275 (38%) 断片性 : 157/275 (56%)	e 値 : 6e-44 同一性 : 104/275 (36%) 断片性 : 154/275 (55%)
CcH38K22.2b	e 値 : 1e-49 同一性 : 111/275 (38%) 断片性 : 159/275 (56%)	e 値 : 7e-49 同一性 : 109/275 (38%) 断片性 : 157/275 (56%)	e 値 : 6e-44 同一性 : 104/275 (36%) 断片性 : 154/275 (55%)

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
16 May 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/38805 A2**(51) International Patent Classification<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/EP01/13034

(22) International Filing Date:  
9 November 2001 (09.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/246,750 9 November 2000 (09.11.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): CENIX  
BIOSCIENCE GMBH [DE/DE], Pfotenhauerstrasse 108,  
01307 Dresden (DE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ECHEVERRI,

Christophe [FR/DE], Schlossberg 10a, 69117 Heidelberg  
(DE). GOENCZY, Pierre [CH/CH], 10, avenue de la  
Harpe, CH-1007 Lausanne (CH). HYMAN, Anthony  
[GB/DE], Hölderlinweg 14, 69120 Heidelberg (DE).  
COULSON, Alan [GB/GB], 28 Blinco Grove, Cambridge  
CB1 7TS (GB). JONES, Steven [GB/CA], 600 West  
10th Avenue, Vancouver, British Columbia V5Z 4E6  
(CA). OEGEMA, Karen [US/DE], Schlossberg 10b,  
69117 Heidelberg (DE). KIRKHAM, Matthew [GB/DE],  
Ladenburgerstrasse 57, 69120 Heidelberg (DE).(74) Agent: ISENBRUCK, Günter; Barchle Pagenberg Dost  
Altenburg Geissler Isenbruck, Theodor-Heuss-Anlage 12,  
68165 Mannheim (DE).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

[Continued on next page]

(54) Title: EUKARYOTIC CELL DIVISION GENES AND THEIR USE IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROLIFERA-  
TIVE DISEASES

## Multiple Sequence Alignment of the H3K22.2a family

Ceu38802.2a  
 Ceu38802.2b  
 Hm07147  
 Hm07148  
 Hm07149  
 Hm07150  
 Hm07151  
 Hm07152  
 Hm07153  
 Hm07154  
 Hm07155  
 Hm07156  
 Hm07157  
 Hm07158  
 Hm07159  
 Hm07160  
 Hm07161  
 Hm07162  
 Hm07163  
 Hm07164  
 Hm07165  
 Hm07166  
 Hm07167  
 Hm07168  
 Hm07169  
 Hm07170  
 Hm07171  
 Hm07172  
 Hm07173  
 Hm07174  
 Hm07175  
 Hm07176  
 Hm07177  
 Hm07178  
 Hm07179  
 Hm07180  
 Hm07181  
 Hm07182  
 Hm07183  
 Hm07184  
 Hm07185  
 Hm07186  
 Hm07187  
 Hm07188  
 Hm07189  
 Hm07190  
 Hm07191  
 Hm07192  
 Hm07193  
 Hm07194  
 Hm07195  
 Hm07196  
 Hm07197  
 Hm07198  
 Hm07199  
 Hm07200  
 Hm07201  
 Hm07202  
 Hm07203  
 Hm07204  
 Hm07205  
 Hm07206  
 Hm07207  
 Hm07208  
 Hm07209  
 Hm07210  
 Hm07211  
 Hm07212  
 Hm07213  
 Hm07214  
 Hm07215  
 Hm07216  
 Hm07217  
 Hm07218  
 Hm07219  
 Hm07220  
 Hm07221  
 Hm07222  
 Hm07223  
 Hm07224  
 Hm07225  
 Hm07226  
 Hm07227  
 Hm07228  
 Hm07229  
 Hm07230  
 Hm07231  
 Hm07232  
 Hm07233  
 Hm07234  
 Hm07235  
 Hm07236  
 Hm07237  
 Hm07238  
 Hm07239  
 Hm07240  
 Hm07241  
 Hm07242  
 Hm07243  
 Hm07244  
 Hm07245  
 Hm07246  
 Hm07247  
 Hm07248  
 Hm07249  
 Hm07250  
 Hm07251  
 Hm07252  
 Hm07253  
 Hm07254  
 Hm07255  
 Hm07256  
 Hm07257  
 Hm07258  
 Hm07259  
 Hm07260  
 Hm07261  
 Hm07262  
 Hm07263  
 Hm07264  
 Hm07265  
 Hm07266  
 Hm07267  
 Hm07268  
 Hm07269  
 Hm07270  
 Hm07271  
 Hm07272  
 Hm07273  
 Hm07274  
 Hm07275  
 Hm07276  
 Hm07277  
 Hm07278  
 Hm07279  
 Hm07280  
 Hm07281  
 Hm07282  
 Hm07283  
 Hm07284  
 Hm07285  
 Hm07286  
 Hm07287  
 Hm07288  
 Hm07289  
 Hm07290  
 Hm07291  
 Hm07292  
 Hm07293  
 Hm07294  
 Hm07295  
 Hm07296  
 Hm07297  
 Hm07298  
 Hm07299  
 Hm07300  
 Hm07301  
 Hm07302  
 Hm07303  
 Hm07304  
 Hm07305  
 Hm07306  
 Hm07307  
 Hm07308  
 Hm07309  
 Hm07310  
 Hm07311  
 Hm07312  
 Hm07313  
 Hm07314  
 Hm07315  
 Hm07316  
 Hm07317  
 Hm07318  
 Hm07319  
 Hm07320  
 Hm07321  
 Hm07322  
 Hm07323  
 Hm07324  
 Hm07325  
 Hm07326  
 Hm07327  
 Hm07328  
 Hm07329  
 Hm07330  
 Hm07331  
 Hm07332  
 Hm07333  
 Hm07334  
 Hm07335  
 Hm07336  
 Hm07337  
 Hm07338  
 Hm07339  
 Hm07340  
 Hm07341  
 Hm07342  
 Hm07343  
 Hm07344  
 Hm07345  
 Hm07346  
 Hm07347  
 Hm07348  
 Hm07349  
 Hm07350  
 Hm07351  
 Hm07352  
 Hm07353  
 Hm07354  
 Hm07355  
 Hm07356  
 Hm07357  
 Hm07358  
 Hm07359  
 Hm07360  
 Hm07361  
 Hm07362  
 Hm07363  
 Hm07364  
 Hm07365  
 Hm07366  
 Hm07367  
 Hm07368  
 Hm07369  
 Hm07370  
 Hm07371  
 Hm07372  
 Hm07373  
 Hm07374  
 Hm07375  
 Hm07376  
 Hm07377  
 Hm07378  
 Hm07379  
 Hm07380  
 Hm07381  
 Hm07382  
 Hm07383  
 Hm07384  
 Hm07385  
 Hm07386  
 Hm07387  
 Hm07388  
 Hm07389  
 Hm07390  
 Hm07391  
 Hm07392  
 Hm07393  
 Hm07394  
 Hm07395  
 Hm07396  
 Hm07397  
 Hm07398  
 Hm07399  
 Hm07400  
 Hm07401  
 Hm07402  
 Hm07403  
 Hm07404  
 Hm07405  
 Hm07406  
 Hm07407  
 Hm07408  
 Hm07409  
 Hm07410  
 Hm07411  
 Hm07412  
 Hm07413  
 Hm07414  
 Hm07415  
 Hm07416  
 Hm07417  
 Hm07418  
 Hm07419  
 Hm07420  
 Hm07421  
 Hm07422  
 Hm07423  
 Hm07424  
 Hm07425  
 Hm07426  
 Hm07427  
 Hm07428  
 Hm07429  
 Hm07430  
 Hm07431  
 Hm07432  
 Hm07433  
 Hm07434  
 Hm07435  
 Hm07436  
 Hm07437  
 Hm07438  
 Hm07439  
 Hm07440  
 Hm07441  
 Hm07442  
 Hm07443  
 Hm07444  
 Hm07445  
 Hm07446  
 Hm07447  
 Hm07448  
 Hm07449  
 Hm07450  
 Hm07451  
 Hm07452  
 Hm07453  
 Hm07454  
 Hm07455  
 Hm07456  
 Hm07457  
 Hm07458  
 Hm07459  
 Hm07460  
 Hm07461  
 Hm07462  
 Hm07463  
 Hm07464  
 Hm07465  
 Hm07466  
 Hm07467  
 Hm07468  
 Hm07469  
 Hm07470  
 Hm07471  
 Hm07472  
 Hm07473  
 Hm07474  
 Hm07475  
 Hm07476  
 Hm07477  
 Hm07478  
 Hm07479  
 Hm07480  
 Hm07481  
 Hm07482  
 Hm07483  
 Hm07484  
 Hm07485  
 Hm07486  
 Hm07487  
 Hm07488  
 Hm07489  
 Hm07490  
 Hm07491  
 Hm07492  
 Hm07493  
 Hm07494  
 Hm07495  
 Hm07496  
 Hm07497  
 Hm07498  
 Hm07499  
 Hm07500  
 Hm07501  
 Hm07502  
 Hm07503  
 Hm07504  
 Hm07505  
 Hm07506  
 Hm07507  
 Hm07508  
 Hm07509  
 Hm07510  
 Hm07511  
 Hm07512  
 Hm07513  
 Hm07514  
 Hm07515  
 Hm07516  
 Hm07517  
 Hm07518  
 Hm07519  
 Hm07520  
 Hm07521  
 Hm07522  
 Hm07523  
 Hm07524  
 Hm07525  
 Hm07526  
 Hm07527  
 Hm07528  
 Hm07529  
 Hm07530  
 Hm07531  
 Hm07532  
 Hm07533  
 Hm07534  
 Hm07535  
 Hm07536  
 Hm07537  
 Hm07538  
 Hm07539  
 Hm07540  
 Hm07541  
 Hm07542  
 Hm07543  
 Hm07544  
 Hm07545  
 Hm07546  
 Hm07547  
 Hm07548  
 Hm07549  
 Hm07550  
 Hm07551  
 Hm07552  
 Hm07553  
 Hm07554  
 Hm07555  
 Hm07556  
 Hm07557  
 Hm07558  
 Hm07559  
 Hm07560  
 Hm07561  
 Hm07562  
 Hm07563  
 Hm07564  
 Hm07565  
 Hm07566  
 Hm07567  
 Hm07568  
 Hm07569  
 Hm07570  
 Hm07571  
 Hm07572  
 Hm07573  
 Hm07574  
 Hm07575  
 Hm07576  
 Hm07577  
 Hm07578  
 Hm07579  
 Hm07580  
 Hm07581  
 Hm07582  
 Hm07583  
 Hm07584  
 Hm07585  
 Hm07586  
 Hm07587  
 Hm07588  
 Hm07589  
 Hm07590  
 Hm07591  
 Hm07592  
 Hm07593  
 Hm07594  
 Hm07595  
 Hm07596  
 Hm07597  
 Hm07598  
 Hm07599  
 Hm07600  
 Hm07601  
 Hm07602  
 Hm07603  
 Hm07604  
 Hm07605  
 Hm07606  
 Hm07607  
 Hm07608  
 Hm07609  
 Hm07610  
 Hm07611  
 Hm07612  
 Hm07613  
 Hm07614  
 Hm07615  
 Hm07616  
 Hm07617  
 Hm07618  
 Hm07619  
 Hm07620  
 Hm07621  
 Hm07622  
 Hm07623  
 Hm07624  
 Hm07625  
 Hm07626  
 Hm07627  
 Hm07628  
 Hm07629  
 Hm07630  
 Hm07631  
 Hm07632  
 Hm07633  
 Hm07634  
 Hm07635  
 Hm07636  
 Hm07637  
 Hm07638  
 Hm07639  
 Hm07640  
 Hm07641  
 Hm07642  
 Hm07643  
 Hm07644  
 Hm07645  
 Hm07646  
 Hm07647  
 Hm07648  
 Hm07649  
 Hm07650  
 Hm07651  
 Hm07652  
 Hm07653  
 Hm07654  
 Hm07655  
 Hm07656  
 Hm07657  
 Hm07658  
 Hm07659  
 Hm07660  
 Hm07661  
 Hm07662  
 Hm07663  
 Hm07664  
 Hm07665  
 Hm07666  
 Hm07667  
 Hm07668  
 Hm07669  
 Hm07670  
 Hm07671  
 Hm07672  
 Hm07673  
 Hm07674  
 Hm07675  
 Hm07676  
 Hm07677  
 Hm07678  
 Hm07679  
 Hm07680  
 Hm07681  
 Hm07682  
 Hm07683  
 Hm07684  
 Hm07685  
 Hm07686  
 Hm07687  
 Hm07688  
 Hm07689  
 Hm07690  
 Hm07691  
 Hm07692  
 Hm07693  
 Hm07694  
 Hm07695  
 Hm07696  
 Hm07697  
 Hm07698  
 Hm07699  
 Hm07700  
 Hm07701  
 Hm07702  
 Hm07703  
 Hm07704  
 Hm07705  
 Hm07706  
 Hm07707  
 Hm07708  
 Hm07709  
 Hm07710  
 Hm07711  
 Hm07712  
 Hm07713  
 Hm07714  
 Hm07715  
 Hm07716  
 Hm07717  
 Hm07718  
 Hm07719  
 Hm07720  
 Hm07721  
 Hm07722  
 Hm07723  
 Hm07724  
 Hm07725  
 Hm07726  
 Hm07727  
 Hm07728  
 Hm07729  
 Hm07730  
 Hm07731  
 Hm07732  
 Hm07733  
 Hm07734  
 Hm07735  
 Hm07736  
 Hm07737  
 Hm07738  
 Hm07739  
 Hm07740  
 Hm07741  
 Hm07742  
 Hm07743  
 Hm07744  
 Hm07745  
 Hm07746  
 Hm07747  
 Hm07748  
 Hm07749  
 Hm07750  
 Hm07751  
 Hm07752  
 Hm07753  
 Hm07754  
 Hm07755  
 Hm07756  
 Hm07757  
 Hm07758  
 Hm07759  
 Hm07760  
 Hm07761  
 Hm07762  
 Hm07763  
 Hm07764  
 Hm07765  
 Hm07766  
 Hm07767  
 Hm07768  
 Hm07769  
 Hm07770  
 Hm07771  
 Hm07772  
 Hm07773  
 Hm07774  
 Hm07775  
 Hm07776  
 Hm07777  
 Hm07778  
 Hm07779  
 Hm07780  
 Hm07781  
 Hm07782  
 Hm07783  
 Hm07784  
 Hm07785  
 Hm07786  
 Hm07787  
 Hm07788  
 Hm07789  
 Hm07790  
 Hm07791  
 Hm07792  
 Hm07793  
 Hm07794  
 Hm07795  
 Hm07796  
 Hm07797  
 Hm07798  
 Hm07799  
 Hm07800  
 Hm07801  
 Hm07802  
 Hm07803  
 Hm07804  
 Hm07805  
 Hm07806  
 Hm07807  
 Hm07808  
 Hm07809  
 Hm07810  
 Hm07811  
 Hm07812  
 Hm07813  
 Hm07814  
 Hm07815  
 Hm07816  
 Hm07817  
 Hm07818  
 Hm07819  
 Hm07820  
 Hm07821  
 Hm07822  
 Hm07823  
 Hm07824  
 Hm07825  
 Hm07826  
 Hm07827  
 Hm07828  
 Hm07829  
 Hm07830  
 Hm07831  
 Hm07832  
 Hm07833  
 Hm07834  
 Hm07835  
 Hm07836  
 Hm07837  
 Hm07838  
 Hm07839  
 Hm07840  
 Hm07841  
 Hm07842  
 Hm07843  
 Hm07844  
 Hm07845  
 Hm07846  
 Hm07847  
 Hm07848  
 Hm07849  
 Hm07850  
 Hm07851  
 Hm07852  
 Hm07853  
 Hm07854  
 Hm07855  
 Hm07856  
 Hm07857  
 Hm07858  
 Hm07859  
 Hm07860  
 Hm07861  
 Hm07862  
 Hm07863  
 Hm07864  
 Hm07865  
 Hm07866  
 Hm07867  
 Hm07868  
 Hm07869  
 Hm07870  
 Hm07871  
 Hm07872  
 Hm07873  
 Hm07874  
 Hm07875  
 Hm07876  
 Hm07877  
 Hm07878  
 Hm07879  
 Hm07880  
 Hm07881  
 Hm07882  
 Hm07883  
 Hm07884  
 Hm07885  
 Hm07886  
 Hm07887  
 Hm07888  
 Hm07889  
 Hm07890  
 Hm07891  
 Hm07892  
 Hm07893  
 Hm07894  
 Hm07895  
 Hm07896  
 Hm07897  
 Hm07898  
 Hm07899  
 Hm07900  
 Hm07901  
 Hm07902  
 Hm07903  
 Hm07904  
 Hm07905  
 Hm07906  
 Hm07907  
 Hm07908  
 Hm07909  
 Hm07910  
 Hm07911  
 Hm07912  
 Hm07913  
 Hm07914  
 Hm07915  
 Hm07916  
 Hm07917  
 Hm07918  
 Hm07919  
 Hm07920  
 Hm07921  
 Hm07922  
 Hm07923  
 Hm07924  
 Hm07925  
 Hm07926  
 Hm07927  
 Hm07928  
 Hm07929  
 Hm07930  
 Hm07931  
 Hm07932  
 Hm07933  
 Hm07934  
 Hm07935  
 Hm07936  
 Hm07937  
 Hm07938  
 Hm07939  
 Hm07940  
 Hm07941  
 Hm07942  
 Hm07943  
 Hm07944  
 Hm07945  
 Hm07946  
 Hm07947  
 Hm07948  
 Hm07949  
 Hm07950  
 Hm07951  
 Hm07952  
 Hm07953  
 Hm07954  
 Hm07955  
 Hm07956  
 Hm07957  
 Hm07958  
 Hm07959  
 Hm07960  
 Hm07961  
 Hm07962  
 Hm07963  
 Hm07964  
 Hm07965  
 Hm07966  
 Hm07967  
 Hm07968  
 Hm07969  
 Hm07970  
 Hm07971  
 Hm07972  
 Hm07973  
 Hm07974  
 Hm07975  
 Hm07976  
 Hm07977  
 Hm07978  
 Hm07979  
 Hm07980  
 Hm07981  
 Hm07982  
 Hm07983  
 Hm07984  
 Hm07985  
 Hm07986  
 Hm07987  
 Hm07988  
 Hm07989  
 Hm07990  
 Hm07991  
 Hm07992  
 Hm07993  
 Hm07994  
 Hm07995  
 Hm07996  
 Hm07997  
 Hm07998  
 Hm07999  
 Hm08000  
 Hm08001  
 Hm08002  
 Hm08003  
 Hm08004  
 Hm08005  
 Hm08006  
 Hm08007  
 Hm08008  
 Hm08009  
 Hm08010  
 Hm08011  
 Hm08012  
 Hm08013  
 Hm08014  
 Hm08015  
 Hm08016  
 Hm08017  
 Hm08018  
 Hm08019  
 Hm08020  
 Hm08021  
 Hm08022  
 Hm08023  
 Hm08024  
 Hm08025  
 Hm08026  
 Hm08027  
 Hm08028  
 Hm08029  
 Hm08030  
 Hm08031  
 Hm08032  
 Hm08033  
 Hm08034  
 Hm08035  
 Hm08036  
 Hm08037  
 Hm08038  
 Hm08039  
 Hm08040  
 Hm08041  
 Hm08042  
 Hm08043  
 Hm08044  
 Hm08045  
 Hm08046  
 Hm08047  
 Hm08048  
 Hm08049  
 Hm08050  
 Hm08051  
 Hm08052  
 Hm08053  
 Hm08054  
 Hm08055  
 Hm08056  
 Hm08057  
 Hm08058  
 Hm08059  
 Hm08060  
 Hm08061  
 Hm08062  
 Hm08063  
 Hm08064  
 Hm08065  
 Hm08066  
 Hm08067  
 Hm08068  
 Hm08069  
 Hm08070  
 Hm08071  
 Hm08072  
 Hm08073  
 Hm08074  
 Hm08075  
 Hm08076  
 Hm08077  
 Hm08078  
 Hm08079  
 Hm08080  
 Hm08081  
 Hm08082  
 Hm08083  
 Hm08084  
 Hm08085  
 Hm08086  
 Hm08087  
 Hm08088  
 Hm08089  
 Hm08090  
 Hm08091  
 Hm08092  
 Hm08093  
 Hm08094  
 Hm08095  
 Hm08096  
 Hm08097  
 Hm08098  
 Hm08099  
 Hm08100  
 Hm08101  
 Hm08102  
 Hm08103  
 Hm08104  
 Hm08105  
 Hm08106  
 Hm08107  
 Hm08108  
 Hm08109  
 Hm08110  
 Hm08111  
 Hm08112  
 Hm08113  
 Hm08114  
 Hm08115  
 Hm08116  
 Hm08117  
 Hm08118  
 Hm08119  
 Hm08120  
 Hm08121  
 Hm08122  
 Hm08123  
 Hm08124  
 Hm08125  
 Hm08126  
 Hm08127  
 Hm08128  
 Hm081

WO 02/38805 A2



LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW.

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

**Published:**

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 1 -

---

**Eukaryotic cell division genes and their use in diagnosis and treatment of  
proliferative diseases**

---

5

In a first aspect, the present invention is related to the significant functional role of several *C. elegans* genes and of their corresponding gene products in cell division and proliferation processes that could be identified by means of RNA-mediated interference (RNAi).

10 In a second aspect, the invention relates to the identification and isolation of functional orthologues of said genes and their gene products found in other eukaryotic species, in particular man, including all biologically-active derivatives thereof.

In a third aspect, the present invention includes the use of said genes and gene products (including said orthologues) in the development or isolation of anti-proliferative agents for instance their use in appropriate screening assays and in methods for diagnosis and  
15 treatment of proliferative diseases.

In a forth aspect, the invention relates to antibodies to said gene products and their use in the development or isolation of anti-proliferative agents and in methods for diagnosis and treatment of proliferative diseases.

20 In a fifth aspect, the present invention is related to the use of these genes and gene products for developing structural models or other models for evaluating drug binding and efficacy as well as to any other uses which are derived from the new functions described here and which will become apparent from the disclosure of the present application for any person skilled in the art.

25 Metazoan cell division consists of an extremely complex, highly regulated set of cellular processes which must be tightly co-ordinated, perfectly timed, and closely monitored in order to ensure the correct delivery of cellular materials to daughter cells. Defects in these processes are known to cause a wide range of so-called proliferative diseases, including all forms of cancer. Since cell division represents one of the few, if not the only cellular  
30 process that is common to the aetiology of all forms of cancer, its specific inhibition has

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 2 -

long been recognised as a preferred site of therapeutic intervention. Although mitotic inhibitor drugs are recognised as one of the most promising classes of chemotherapeutic agent, screening attempts to find new drug candidates in this class have been undermined by the strong inherent tendency of such screens to identify agents that target a single  
5 protein, tubulin. Tubulin polymerises to form microtubules, the primary cytoskeletal elements needed for mitotic spindle function and chromosome segregation. Microtubule functions, however, are ubiquitously needed in almost all cell types, whether dividing or not, a fact which therefore explains many of the unwanted side effects caused by anti-tubulin drugs.

10

Perhaps the best known example of a highly successful anti-neoplastic drug that targets tubulin is provided by paclitaxel, and its marketed derivative, Taxol, from Bristol Meyers Squibb. Its applicability has indeed been seriously limited by difficulties in determining an adequate dosing regimen due to a range of problematic side effects. Taxol treatment has  
15 resulted in anaphylaxis and severe hypersensitivity reactions characterised by dyspnea and hypotension requiring treatment, angioedema, and generalised urticaria in 2-4% of patients in clinical trials. All Taxol is administered after pretreatment with corticosteroids and despite pretreatment, fatal reactions have occurred. Severe conductance abnormalities resulting in life-threatening cardiac arrhythmia occur in less than 1 percent of patients and  
20 must be treated by insertion of a pacemaker. Taxol can cause fetal harm or fetal death in pregnant women. Furthermore, administration is commonly accompanied by tachycardia, hypotension, flushing, skin reactions and shortness-of-breath (mild dyspnea).

Despite these shortcomings, Taxol has been hailed by many as the most successful new  
25 anti-cancer therapeutic of the last three decades. Clearly, there is good justification for attempting to add to the list of mitotic inhibitors used to treat cancer. However, additional drugs that target tubulin or interfere with microtubule dynamics may be expected to have similar applicability and limitations as Taxol.

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 3 -

The task of the present invention therefore is to find new potential target proteins/genes for therapeutical drugs other than tubulin that are essential for completion of mitosis. These proteins/genes may provide novel targets to screen for new anti-neoplastic or cytotoxic anti-cancer agents.

5

Unfortunately, until now, the systematic identification of such target proteins/genes using genetic screening methods has been difficult in metazoans, and has relied heavily on the use of the unicellular yeast. Several major advances in the use of certain metazoan model organisms, particularly the nematode worm *Caenorhabditis elegans*, have now begun to offer new ways of bridging this gap.

10

The above-mentioned task of the invention to find new potential target proteins/genes for therapeutical drugs other than tubulin involved in mitosis processes is solved by a screening assay in *C. elegans* based on 'genomic RNA mediated interference (RNAi)' combined with a highly probative microscopic assay for documenting the first rounds of embryonic cell division (Sulston *et al.*, The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64-119 (1983); Gönczy *et al.*, Dissection of cell division processes in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo by mutational analysis. *J Cell Biol* 144, 927-946 (1999)). With this combination of techniques a selected gene and also a variety of selected genes can be functionally characterized with unprecedented speed and efficiency.

20

The nematode *C. elegans* exhibits an almost entirely translucent body throughout its development, thereby offering unparalleled microscopic access for exquisitely detailed cytological documentation, even for the earliest steps of embryogenesis. This important feature, along with its short life cycle (3-5 days), its ease of cultivation, and its low maintenance costs, has helped make *C. elegans* arguably the best studied of all metazoans. Also, sequence data are now available for over 97% of the *C. elegans* genome (*C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018 (1998)). Thus, *C. elegans* has proven to be

25

30

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 4 -

an ideal organism for applying the new technique of RNA-mediated interference (RNAi). This technique consists in the targeted, sequence-specific inhibition of gene expression, as mediated by the introduction into an adult worm of double-stranded RNA (dsRNA) molecules corresponding to portions of the coding sequences of interest (Fire *et al.*, Potent  
5 and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811 (1998)). For the vast majority of *C. elegans* genes tested to date, this has been shown to yield a sequence-specific inhibition of the targeted gene's expression, accompanied by clearly detectable loss of function phenotypes in the treated worm's F1 progeny (and even in some cases, in the treated worm itself).

10

A large-scale RNAi technique-based screen was performed for 2,232 (that means 96%) of the predicted open reading frames on chromosome III of *C. elegans* which is described in detail in G6nczy *et al.*, "Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III" *Nature* 408, 331-336 (2000). For the performance of  
15 this large-scale screen double-stranded RNA corresponding to the individual open reading frames was produced and micro-injected into adult *C. elegans* hermaphrodites, and the resulting embryos were analysed 24 hours later using time-lapse DIC microscopy.

Besides others, the *C. elegans* genes H38K22.2 (Genbank/EMBL ID: AL024499, provided in SEQ ID NO. 1 - 3), C02F5.1 (Genbank/EMBL ID: L14745; , provided in SEQ ID NO. 4  
20 and 5) and F10E9.8 (GenBank/EMBL ID: L10986; provided in SEQ ID NO. 6 and 7) gave rise to a phenotype detectable by the DIC-assay implying a functional role of these genes in metazoan cell division processes.

In at least one case ( for H38K22.2) it had also been possible to identify a structurally and functionally homologous gene, a so-called orthologous gene, in another species, in  
25 particular *Homo sapiens*, namely the human orthologue RP42.

For the mouse orthologue of the RP42 gene it had merely been known that the gene shows a strongly developmentally regulated expression, particularly in proliferating neuroblasts from which neocortical neurons originate (Mas *et al.*, "Cloning and expression of a novel gene, RP42, mapping to an autism susceptibility locus on 6Q16" *Genomics* 1; 65 (1), 70-  
30 74 (2000)). The functional role of RP42 in cell division and proliferation processes that

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 5 -

makes it an excellent tool for the development or identification of drugs for diagnosis and/or therapy of proliferative diseases was not known so far.

With the essential function of said genes in cell division and proliferation known, these  
5 newly identified target genes and their corresponding gene products, any homologues, orthologues and derivatives thereof represent excellent tools for use in the development and isolation of a wide range of therapeutics including anti-proliferative agents and in the development of methods for diagnosis and treatment of proliferative diseases.

10 Therefore, in a first aspect, the present invention relates to isolated nucleic acid molecules encoding a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation or a fragment thereof and comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of:

- 15 (a) the nucleic acid sequences presented in SEQ ID NO. 1 to 3, SEQ ID NO. 4 to 5, SEQ ID NO. 6 to 7, SEQ ID NO. 12 and fragments thereof and their complementary strands,
- (b) nucleic acid sequences encoding polypeptides that exhibit a sequence identity with SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 or SEQ ID NO. 13 of at least 25 % over 100 residues and/or which are detectable in a  
20 computer aided search using the blast sequence analysis programs with an e-value of at most  $10^{-30}$ ,
- (c) nucleic acid sequences which are capable of hybridizing with the nucleic acid sequences of (a) or (b) under conditions of medium stringency,
- 25 (d) nucleic acid sequences which are degenerate as a result of the genetic code to any of the sequences defined in (a), (b) or (c).



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 6 -

The above mentioned fragments of the isolated nucleic acid molecules may comprise a at least 15 nucleotides and preferably at least 20 nucleotides.

Additionally the above mentioned isolated nucleic acid molecules may be single or double-stranded DNA-molecules as well as single- or double-stranded RNA-molecules.

5

a):

The nucleic acid sequences of those nucleic acid molecules encoding a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation as mentioned in a) are provided in the sequence listing

- 10 as SEQ ID NO. 1 - 3 (*C. elegans* genes H38K22.2 (Genbank/EMBL ID: AL024499)),  
as SEQ ID NO. 4 and 5 (*C. elegans* gene C02F5.1 (Genbank/EMBL ID: L14745)),  
as SEQ ID NO. 6 and 7 (*C. elegans* gene F10E9.8 (GenBank/EMBL ID: L10986)) and  
as SEQ ID NO. 12 (the human H38K22.2 orthologue, the RP42 protein (NCBI Accession No. AF292100)).

- 15 The corresponding deduced amino acid sequences of these target genes are disclosed in SEQ ID NO. 8 (for H38K22.2a), in SEQ ID NO. 9 (for H38K22.2b), in SEQ ID NO. 10 (for C02F5.1), in SEQ ID NO. 11 (for F10E9.8) and in SEQ ID NO. 13 (for RP42).

b):

- 20 Additionally, the present invention also comprises isolated nucleic acid molecules that are structurally and functionally homologous counterparts (particularly orthologues) of at least one of said target genes as disclosed in SEQ ID NO 1 to 7 or 12.

- Those homologous nucleic acid molecules may encode polypeptides that exhibit a sequence identity with SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 or  
25 SEQ ID NO. 13 of at least 25 % over 100 residues, preferably of at least 30 % over 100 residues, more preferably of at least 35 % over 100 residues and most preferably at least 40 % over 100 residues.

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 7 -

Fig. 5 shows that the aforementioned sequence identities are significant homologies that are appropriate to identify a polypeptide as an orthologue of the target proteins as depicted in SEQ ID NO. 8 -11, and 13. Fig. 5 shows a multiple sequence alignment of the H38K22.2a family on protein level generated with a BLAST sequence analysis program. In this alignment the two *C. elegans* splice variants H38K22.2a and H38K22.2b are compared to their corresponding orthologues in *Drosophila* (CG7427), in mouse (AAF04863) and in *Homo sapiens* (AAH09478). The statistics in Fig 5 for the alignments show that the sequence identity on protein level between the *C. elegans* clone H38K22.2a and its human orthologue (AAH09478) is 36 % over 299 residues. Similarly, the sequence identities between *C. elegans* clone H38K22.2b (the other splice variant) and its human orthologue is 36 % over 238 residues. It is obvious to anyone skilled in the art that these sequence homologies are significant homologies and that therefore the human clone with the accession No. AAH09478 is unambiguously identified as the human orthologue of the *C. elegans* clones H38K22.2a and H38K22.2b.

The invention also comprises isolated nucleic acid molecules that are detectable in a computer aided search using one of the BLAST sequence analysis programs with an e-value of at most  $10^{-30}$ , preferably with an e-value of at most  $10^{-35}$ , more preferably with an e-value of at most  $10^{-40}$ .

Fig. 5 shows that the aforementioned e-values characterize significant sequence homologies that are appropriate to identify a polypeptide as an orthologue of the target proteins as depicted in SEQ ID NO. 8 -11, and 13.

The BLAST sequence analysis programs are programs used for sequence analysis that are publically available and known to anyone skilled in the art. When sequence alignments are done by a BLAST sequence analysis program, most of those programs calculate so called "e-values" to characterize the grade of homology between the compared sequences. Generally a small e-value characterizes a high sequence identity / homology, whereas larger e-values characterize lower sequence identities / homologies.

"Homology" means the degree of identity between two known sequences. As stated above, homologies, that means sequence identities, may suitably be determined by means of computer programs known in the art. The degree of homology required for the sequence variant will depend upon the intended use of the sequence. It is well within the capability

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 8 -

of a person skilled in the art to effect mutational, insertional and deletional mutations which are designed to improve the function of the sequence or otherwise provide a methodological advantage.

5 c):

The present invention further relates to isolated nucleic acid sequences or fragments thereof which are capable of hybridizing with the nucleic acid sequences of (a) or (b) under conditions of medium/high stringency.

10 The grade of sequence identity between a first and a second nucleic acid molecule can also be characterized by the capability of the first nucleic acid molecule to hybridize under certain conditions to a second nucleic acid molecule.

Suitable experimental conditions for determining whether a given DNA or RNA sequence "hybridizes" to a specified polynucleotide or oligonucleotide probe involve presoaking of the filter containing the DNA or RNA to examine for hybridization in 5 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) buffer for 10 minutes, and prehybridization of the filter in a  
15 solution of 5 x SSC, 5 x Denhardt's solution, 0.5 % SDS and 100 mg/ml of denaturated sonicated salmon sperm DNA (Maniatis et al., 1989), followed by hybridization in the same solution containing a concentration of 10 ng/ml of a random primed (Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983), *Anal. Biochem.* 132:6-13), <sup>32</sup>P-dCTP-labeled (specific activity > 1 x  
20 10<sup>9</sup> cpm/μg) probe for 12 hours at approximately 45°C. The filter is then washed twice for 30 minutes in 2 x SSC, 0.5% SDS at at least 55°C (low stringency), at least 60°C (medium stringency), preferably at least 65°C (medium/high stringency), more preferably at least 70°C (high stringency) or most preferably at least 75°C (very high stringency). Molecules to which the probe hybridizes under the chosen conditions are detected using an x-ray film.

25

d):

The present invention further relates to isolated nucleic acid molecules or fragments thereof which are degenerate as a result of the genetic code to any of the sequences defined in (a), (b) or (c).

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 9 -

The application of automated gene synthesis provides an opportunity for generating sequence variants of the naturally occurring genes. It will be appreciated, for example, that polynucleotides coding for the same gene products can be generated by substituting synonymous codons for those represented in the naturally occurring polynucleotide sequences as identified herein. Such sequences will be referred to as "degenerate" to the naturally occurring sequences. In addition, polynucleotides coding for synthetic variants of the corresponding amino acid sequences can be generated which, for example, will result in one or more amino acids substitutions, deletions or additions. Also, nucleic acid molecules comprising one or more synthetic nucleotide derivatives (including morpholinos) which provide said nucleotide sequence with a desired feature, e.g. a reactive or detectable group, can be prepared. Synthetic derivatives with desirable properties may also be included in the corresponding polypeptides. All such derivatives and fragments of the above identified genes and gene products showing at least part of the biological activity of the naturally occurring sequences or which are still suitable to be used, for example, as probes for, e.g. identification of homologous genes or gene products, are included within the scope of the present invention.

Having herein provided the nucleotide sequences of various genes functionally involved in cell division and proliferation, it will be appreciated that automated techniques of gene synthesis and/or amplification may be used to isolate said nucleic acid molecules *in vitro*. Because of the length of some coding sequences, application of automated synthesis may require staged gene construction, in which regions of the gene up to about 300 nucleotides in length are synthesized individually and then ligated in correct succession for final assembly. Individually synthesized gene regions can be amplified prior to assembly, using polymerase chain reaction (PCR) technology. The technique of PCR amplification may also be used to directly generate all or part of the final genes/nucleic acid molecules. In this case, primers are synthesized which will be able to prime the PCR amplification of the final product, either in one piece or in several pieces that may be ligated together. For this purpose, either cDNA or genomic DNA may be used as the template for the PCR amplification. The cDNA template may be derived from commercially available or self-constructed cDNA libraries.

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 10 -

In a second aspect, the invention relates to nucleic acid probes comprising a nucleic acid sequence as previously characterized under (a) to (d) which may be a polynucleotide or an oligonucleotide comprising at least 15 nucleotides containing a detectable label.

These nucleic acid probes may be synthesized by use of DNA synthesizers according to standard procedures or, preferably for long sequences, by use of PCR technology with a selected template sequence and selected primers. In the use of the nucleotide sequences as probes, the particular probe may be labeled with any suitable label known to those skilled in the art, including radioactive and non-radioactive labels. Typical radioactive labels include  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , or the like. A probe labeled with a radioactive isotope can be constructed from a DNA template by a conventional nick translation reaction using a DNase and DNA polymerase. Non-radioactive labels include, for example, ligands such as biotin or thyroxine, or various luminescent or fluorescent compounds. The probe may also be labeled at both ends with different types of labels, for example with an isotopic label at one end and a biotin label at the other end. The labeled probe and sample can then be combined in a hybridization buffer solution and held at an appropriate temperature until annealing occurs.

The invention also includes an assay kit comprising either an isolated nucleic acid molecule as defined above or a fragment thereof or a probe as defined above in a suitable container.

Duplex formation and stability depend on substantial complementarity between the two strands of a hybrid and a certain degree of mismatch can be tolerated. Therefore, the nucleic acid molecules and probes of the present invention may include mutations (both single and multiple), deletions, insertions of the above identified sequences, and combinations thereof, as long as said sequence variants still have substantial sequence homology to the original sequence which permits the formation of stable hybrids with the target nucleotide sequence of interest.

The above identified nucleic acid molecules and probes coding for polypeptides functionally involved in cell division and proliferation or a part thereof will have a wide range of useful applications, including their use for identifying homologous, in particular orthologous, genes in the same or different species, their use in screening assays for

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 11 -

identification of interacting drugs that inhibit, stimulate or effect cell division or proliferation, their use for developing computational models, structural models or other models for evaluating drug binding and efficacy, and their diagnostic or therapeutic use for detection or treatment of diseases associated with anomalous and/or excessive cell division  
5 or proliferation, in particular neoplastic diseases, including both solid tumors and hemopoietic cancers, or coronary restenosis. Exemplary neoplastic diseases include carcinomas, such as adenocarcinomas and melanomas; mesodermal tumors, such as neuroblastomas and retinoblastomas; sarcomas and various leukemias; and lymphomas. Of particular interest are tumors of the breast, ovaries, gastrointestinal tract, liver, lung,  
10 thyroid glands, prostate gland, brain, pancreas, urinary tract, and salivary glands. Still more specific, tumors of the breast, ovaries, lung, colon, and lymphomas are contemplated.

In a third aspect, the present invention relates to the use of the above identified nucleic acid molecules and probes for diagnostic purposes. This diagnostic use of the above identified  
15 nucleic acid molecules and probes may include, but is not limited to the quantitative detection of the expression of said target genes in biological probes (preferably, but not limited to cell extracts, body fluids, etc.), particularly by quantitative hybridization to the endogenous nucleic acid molecules comprising the above-characterized nucleic acid  
20 sequences (particularly cDNA, RNA). An abnormal and/or excessive expression of said target genes involved in cell division may be diagnosed that way.

In a forth aspect, the present invention relates to the use of the above identified nucleic acid molecules, probes or their corresponding polypeptides for therapeutical purposes.  
25

This therapeutical use of the above identified nucleic acid molecules, probes or their corresponding polypeptides may include, but is not limited to the use of said nucleic acid molecules and their corresponding polypeptides for direct or indirect inhibition of the expression of said target genes and/or for inhibition of the function of said target genes.  
30 Particularly gene therapy vectors, e.g. viruses, or naked or encapsulated DNA or RNA (e.g. an antisense nucleotide sequence) with the above-identified sequences might be suitable

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 12 -

for the introduction into the body of a subject suffering from a proliferative disease or from a disease affecting cell division for therapeutic purposes.

5 A particularly preferred therapeutical use of the above identified nucleic acid molecules or probes relates to their use in a therapeutical application of the RNAi technique, particularly in humans or in human cells.

Double-stranded RNA oligonucleotides effect silencing of the expression of gene(s) which are highly homologous to either of the RNA strands in the duplex. Recent discoveries reveal that this effect, called RNA interference (RNAi), that had been originally discovered  
10 in *C. elegans*, can also be observed in cells, particularly in human cells. Therefore the invention further comprises the use of double-stranded RNA oligonucleotides with the above identified nucleotide sequences (as stated in a) to d)), preferably with a length of at least 15 nucleotides (nt), more preferably with a length of at least 20 nt, for therapeutical silencing of the expression of genes involved in cell division or proliferation in cells of  
15 other species, particularly in human cells. This therapeutical use particularly applies to cells of an individual that suffers from a disease associated with anomalous and/or excessive cell division or proliferation, particularly a coronary restinosis or a neoplastic disease selected from the group consisting of lymphoma, lung cancer, colon cancer, ovarian cancer and breast cancer.

20

In a fifth aspect, the invention further comprises a nucleic acid construct or a recombinant vector having incorporated the nucleic acid molecules as defined in (a) to (d) or a fragment thereof.

“Nucleic acid construct” is defined herein as any nucleic acid molecule, either single- or  
25 double-stranded, in which nucleic acid sequences are combined and juxtaposed in a manner which will not occur naturally. The vector may be any vector which can be conveniently subjected to recombinant DNA procedures. The choice of the vector will usually depend on the host cell into which it is to be introduced. The vector may be an extrachromosomal entity, the replication of which is independent of chromosomal replication, e.g. a plasmid. Alternatively, the vector may be one which, when introduced  
30 into a host cell, is integrated into the host cell genome and replicated together with the chromosome(s) into which it has been integrated.

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 13 -

The vector is preferably an expression vector in which the nucleic acid molecule as defined in (a) to (d) or a fragment thereof is operably linked to heterologous or homologous control sequences. The term "control sequences" is defined herein to include all components  
5 which are necessary or advantageous for expression of the coding nucleic acid sequence. Such control sequences include, but are not limited to, a promoter, a ribosome binding site, translation initiation and termination signals and, optionally, a repressor gene or various activator genes. Control sequences are referred to as "homologous" if they are naturally linked to the coding nucleic acid sequence of interest and referred to as "heterologous" if  
10 this is not the case. The term "operably linked" indicates that the sequences are arranged so that they function in concert for their intended purpose, i.e. expression of the desired protein.

The promoter may be any DNA sequence which shows transcriptional activity in the host  
15 cell of choice and may be derived from genes encoding proteins either homologous or heterologous to the host cell.

Examples of suitable promoters for directing the transcription in a bacterial host are, e.g., the phage Lambda P<sub>R</sub> or P<sub>L</sub> promoters, the *lac*, *trp* or *tac* promoters of *E. coli*, the promoter  
20 of the *Bacillus subtilis* alkaline protease gene or the *Bacillus licheniformis* alpha-amylase gene.

Examples of suitable promoters for directing the transcription in mammalian cells are, e.g., the SV40 promoter (Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1 (1981), 854-864), the MT-1  
25 (metallothionein gene) promoter (Palmiter et al., *Science* 222 (1983), 809-814) or the adenovirus 2 major late promoter.

Examples of suitable promoters for use in insect cells are, e.g., the polyhedrin promoter (Vasuvedan et al., *Febs. Lett* 311, (1992), 7-11), the *Autographa californica* polyhedrosis  
30 basic protein promoter (EP 397 485), or the baculovirus immediate early gene 1 promoter (US 5,155,037, US 5,162,222).



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 14 -

Examples of suitable promoters for use in yeast cells include promoters from yeast glycolytic genes (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 1203-12080; Alber and Kawasaki, *J. Mol. Appl. Gen.* 1 (1982), 419-434) and the ADH2-4c promoter (Russell et al., *Nature* 304 (1983), 652-654).

5

The coding sequence may, if necessary, be operably linked to a suitable terminator, such as the human growth hormone terminator (Palmiter et al., *Science* 222, 809-814 (1983)), or a polyadenylation sequence. Also, to permit secretion of the expressed protein, a signal sequence may precede the coding sequence.

10

Further, the vector may comprise a DNA sequence enabling the vector to replicate in the host cell in question. Examples of such sequences are the origins of replication of the plasmids pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 and pIJ702. Another example of such a sequence (when the host cell is a mammalian cell) is the SV40 origin of replication.

15 When the host cell is a yeast cell, suitable sequences enabling the vector to replicate are the yeast plasmid 2 $\mu$  replication genes REP 1-3 and origin of replication.

The vector may also comprise a selectable marker, e.g. a gene coding for a product which complements a defect in the host cell, such as the gene coding for dihydrofolate reductase (DHFR) or a gene which confers resistance to a drug, e.g. ampicillin, kanamycin, tetracyclin, chloramphenicol, neomycin or hygromycin.

20

A number of vectors suitable for expression in prokaryotic or eukaryotic cells are known in the art and several of them are commercially available. Some commercially available mammalian expression vectors which may be suitable include, but are not limited to, pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), pcDNAI (Invitrogen), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593), pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pSV2-dhfr (ATCC 37146).

25

In a sixth aspect, the invention comprises host cells into which the nucleic acid construct or the recombinant vector is introduced. These host cells may be prokaryotic or eukaryotic, including, but not limited to, bacteria, fungal cells, including yeast and filamentous fungi,

30

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 15 -

mammalian cells, including, but not limited to, cell lines of human, bovine, porcine, monkey and rodent origin, and insect cells including, but not limited to, drosophila derived cell lines.

- 5 The selection of an appropriate host cell will be dependent on a number of factors recognized by the art. These include, e.g., compatibility with the chosen vector, toxicity of the (co)products, ease of recovery of the desired protein or polypeptide, expression characteristics, biosafety and costs.

10 Examples of suitable prokaryotic cells are gram positive bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus brevis*, *Streptomyces lividans* etc. or gram negative bacteria such as *E. coli*.

The yeast host cell may be selected from a species of *Saccharomyces* or *Schizosaccharomyces*, e.g. *Saccharomyces cerevisiae*. Useful filamentous fungi may be selected from a species of *Aspergillus*, e.g. *Aspergillus oryzae* or *Aspergillus niger*.

- 15 Cell lines derived from mammalian species which may be suitable and which are commercially available include, but are not limited to, COS-1 (ATCC CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), and MRC-5 (ATCC CCL 171).

- 20 The recombinant vector may be introduced into the host cells according to any one of a number of techniques including, but not limited to, transformation, transfection, protoplast fusion, and electroporation.

- The recombinant host cells are then cultivated in a suitable nutrient medium under conditions permitting the expression of the protein of interest. The medium used to  
25 cultivate the cells may be any conventional medium suitable for growing the host cells, such as minimal or complex media containing appropriate supplements. Suitable media are available from commercial suppliers or may be prepared according to published recipes (e.g. in catalogues of the American Type Culture Collection).

30

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 16 -

Identification of the heterologous polypeptide expressing host cell clones may be done by several means, including, but not limited to, immunological reactivity with specific antibodies.

5 In a seventh aspect, the invention is related to a method for producing a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation or a fragment thereof in a host cell comprising the steps

- (i) transferring the expression vector with an operably linked nucleic acid molecule as defined in (a) to (d) into a suitable host cell, and
- 10 (ii) cultivating the host cells of step (i) under conditions which will permit the expression of said polypeptide or fragment thereof and
- (iii) optionally, secretion of the expressed polypeptide into the culture medium.

In an eighth aspect, the invention comprises a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation or a fragment thereof comprising an amino acid sequence  
15 selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequences depicted in SEQ ID NO. 8, 9, 10, 11 and 13 and fragments thereof,
- (b) amino acid sequences which exhibit a sequence identity with the sequences of  
20 (a) of at least 25 % over 100 residues, preferably of at least 30 % over 100 residues, more preferably of at least 35 % over 100 residues and most preferably of at least 40 % over a 100 residues and/or which are detectable in a computer aided search using the BLAST sequence analysis programs with an e-value of at most  $10^{-30}$ , preferably with an e-value of at most  $10^{-35}$  and most  
25 preferably with an e-value of at most  $10^{-40}$ ,
- (c) amino acid sequences encoded by a nucleic acid molecule that is capable of hybridizing with the nucleic acid sequences of (a) or (b) or encoded by a nucleic acid molecule that is degenerate as a result of the genetic code to any of the sequences as defined in (a) or (b).

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 17 -

- The heterologous polypeptide may also be a fusion polypeptide in which another polypeptide is fused at the N-terminus or the C-terminus of the polypeptide of interest or fragment thereof. A fused polypeptide is produced by fusing a nucleic acid sequence (or a portion thereof) encoding another polypeptide to a nucleic acid sequence (or a portion thereof) of the present invention. Techniques for producing fusion polypeptides are known in the art and include ligating the coding sequences so that they are in frame and the expression of the fusion polypeptide is under control of the same promotor(s) and terminator.
- Expression of the polypeptides of interest may also be performed using *in vitro* produced synthetic mRNA. Synthetic mRNA can be efficiently translated in various cell-free systems, including but not limited to, wheat germ extracts and reticulocyte extracts, as well as efficiently translated in cell based systems including, but not limited to, microinjection into frog oocytes, preferably *Xenopus* oocytes.
- In a ninth aspect, the invention involves antibodies against the above identified polypeptides and against immunogenic fragments thereof. The term "antibody" as used herein includes both polyclonal and monoclonal antibodies, as well as fragments thereof, such as Fv, Fab and F(ab)<sub>2</sub> fragments that are capable of binding antigen or hapten. The present invention also contemplates "humanized" hybrid antibodies wherein amino acid sequences of a non-human donor antibody exhibiting a desired antigen-specificity are combined with sequences of a human acceptor antibody. The donor sequences will usually include at least the antigen-binding amino acid residues of the donor but may comprise other structurally and/or functionally relevant amino acid residues of the donor antibody as well. Such hybrids can be prepared by several methods well known in the art (see e.g. WO 89/09622; WO 94/11509; Couto, *Hybridoma* 13 (1994), 215-219; Presta, *Cancer Research* 57 (1997), 4593-4599). The antibodies of the present invention will have a wide range of useful applications, including their use for affinity purification of the corresponding immunogenic (poly)peptides, their use for the preparation of anti-idiotypic antibodies, as well as their use as specific binding agents in various assays, e.g. diagnostic or drug-screening assays, or in a method for treatment of diseases associated with anomalous and/or excessive cell division or proliferation as exemplified above. Specifically, said

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 18 -

antibodies or suitable fragments thereof, particularly in humanized form, may be used as therapeutic agents in a method for treating cancer and other diseases associated with anomalous and/or excessive cell division or proliferation as exemplified above. Also, antibodies may be raised to the most characteristic parts of the above identified polypeptides and subsequently be used to identify structurally and/or functionally related polypeptides from other sources as well as mutations and derivatives of the above identified polypeptides.

To raise antibodies against the polypeptides of the present invention, there may be used as an immunogen either the intact polypeptide or an immunogenic fragment thereof, produced in a suitable host cell as described above or by standard peptide synthesis techniques.

Polyclonal antibodies are raised by immunizing animals, such as mice, rats, guinea pigs, rabbits, goats, sheep, horses etc., with an appropriate concentration of the polypeptide or peptide fragment of interest either with or without an immune adjuvant.

Acceptable immune adjuvants include, but are not limited to, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, alum-precipitate, water-in-oil-emulsion containing *Corynebacterium parvum* and tRNA.

In a typical immunization protocol each animal receives between about 0,1 µg and about 1000 µg of the immunogen at multiple sites either subcutaneously (SC), intraperitoneally (IP), intradermally or in any combination thereof in an initial immunization. The animals may or may not receive booster injections following the initial injection. Those animals receiving booster injections are generally given an equal amount of the immunogen in Freund's incomplete adjuvant by the same route at intervals of about three or four weeks until maximal titers are obtained. At about 7-14 days after each booster immunization or about weekly after a single immunization, the animals are bled, the serum collected, and aliquots are stored at about -20°C.

Monoclonal antibodies which are reactive with the polypeptide or peptide fragment of interest are prepared using basically the technique of Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975). First, animals, e.g. Balb/c mice, are immunized using a protocol similar to that described above. Lymphocytes from antibody-positive animals, preferably

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 19 -

splenocytes, are obtained by removing spleens from immunized animals by standard procedures known in the art. Hybridoma cells are produced by mixing the splenocytes with an appropriate fusion partner, preferably myeloma cells, under conditions which will allow the formation of stable hybridomas. Fusion partners may include, but are not limited to:

5 mouse myelomas P3/NS1/Ag 4-1; MPC-11; S-194 and Sp 2/0. Fused hybridoma cells are selected by growth in a selection medium and are screened for antibody production. Positive hybridomas may be grown and injected into, e.g., pristane-primed Balb/c mice for ascites production. Ascites fluid is collected about 1-2 weeks after cell transfer and the monoclonal antibodies are purified by techniques known in the art. Alternatively, *in vitro*

10 production of monoclonal antibodies (mAb) is possible by cultivating the hybridomas in a suitable medium, e.g. DMEM with fetal calf serum, and recovering the mAb by techniques known in the art.

Recovered antibody can then be coupled covalently to a detectable label, such as a radiolabel, enzyme label, luminescent label, fluorescent label or the like, using linker

15 technology established for this purpose.

Antibody titers of ascites or hybridoma culture fluids are determined by various serological or immunological assays which include, but are not limited to, precipitation, passive agglutination, enzyme-linked immunosorbent antibody (ELISA) technique and radioimmunoassay techniques. Similar assays may be used to detect the presence of the

20 above identified polypeptides or fragments thereof in body fluids or tissue and cell extracts.

Assay kits for performing the various assays mentioned in the present application may comprise suitable isolated nucleic acid or amino acid sequences of the above identified genes or gene products, labelled or unlabelled, and/or specific ligands (e.g. antibodies)

25 thereto and auxiliary reagents as appropriate and known in the art. The assays may be liquid phase assays as well as solid phase assays (i.e. with one or more reagents immobilized on a support).

Unless otherwise specified, the manipulations of nucleic acids and polypeptides/proteins can be performed using standard methods of molecular biology and immunology (see, e.g.

30 Maniatis et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 20 -

Biology". John Wiley and Sons, 1995; Tijssen, P., Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Elsevier Press, Amsterdam, Oxford, New York, 1985).

5 The invention further includes an assay kit comprising either the polypeptide as defined above or a fragment thereof or an antibody against said polypeptides as defined above or against immunogenic fragments thereof.

10 These recombinant polypeptides or fragments thereof as well as antibodies against those polypeptides or immunogenic fragments thereof will have a wide range of useful applications, including their use in screening assays for interacting drugs that inhibit, stimulate or effect the cell division or proliferation, their use for developing computational models, structural models or other models for evaluating drug binding and efficacy, and their use in a method for diagnosis or treatment of diseases associated with anomalous and/or excessive cell division or proliferation, in particular neoplastic diseases, including  
15 both solid tumors and hemopoietic cancers, or coronary restenosis. Exemplary neoplastic diseases include carcinomas, such as adenocarcinomas and melanomas; mesodermal tumors, such as neuroblastomas and retinoblastomas; sarcomas and various leukemias; and lymphomas. Of particular interest are tumors of the breast, ovaries, gastrointestinal tract, liver, lung, thyroid glands, prostate gland, brain, pancreas, urinary tract, and salivary  
20 glands. Still more specific, tumors of the breast, ovaries, lung, colon, and lymphomas are contemplated.

25 Therefore in a tenth aspect, the present invention explicitly includes the use of polypeptides as defined above or fragments thereof or of antibodies against said polypeptides or immunogenic fragments thereof in a screening assay for interacting drugs that inhibit, stimulate or effect the cell division or proliferation.

30 Such a screening assay for interacting drugs may particularly comprise, but is not limited to the following steps:

1. recombinant expression of said polypeptide or of an appropriate derivative thereof

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 21 -

2. isolation and optionally purification of the recombinantly expressed polypeptide or of its derivative, in particular by affinity chromatography
3. optionally labelling of the chemical compounds that are tested to interact with said polypeptide or its derivative and/or labelling of the recombinantly expressed polypeptide
- 5 4. immobilization of the recombinantly expressed polypeptide or of its derivative to a solid phase
5. binding of a potential interaction partner or a variety thereof to the immobilized polypeptide or its derivative
- 10 6. optionally one or more washing steps
7. detection and/or quantification of the interaction, in particular by monitoring the amount of label remaining associated with the solid phase over background levels.

Step 1 includes the recombinant expression of the above identified polypeptide or of its derivative from a suitable expression system, in particular from cell-free translation, bacterial expression, or baculovirus-based expression in insect cells.

Step 2 comprises the isolation and optionally the subsequent purification of said recombinantly expressed polypeptides with appropriate biochemical techniques that are familiar to a person skilled in the art.

- 20 Alternatively, these screening assays may also include the expression of derivatives of the above identified polypeptides which comprises the expression of said polypeptides as a fusion protein or as a modified protein, in particular as a GST-fusion protein or as a protein bearing a so called "tag"-sequence. These "tags"-sequences consist of short nucleotide sequences that are ligated 'in frame' either to the N- or to the C-terminal end of the coding region of said target gene. One of the most common tags that are used to label
- 25 recombinantly expressed genes is the poly-Histidine-tag which encodes a homopolypeptide consisting merely of histidines. In this context the term "polypeptide" does not merely comprise polypeptides with the nucleic acid sequences of SEQ ID No. 1 bis 7, their naturally occurring homologues, preferably orthologues, more preferably human
- 30 orthologues, in particular the RP42 gene (SEQ ID No. 12), but also derivatives of these polypeptides, in particular fusion proteins or polypeptides comprising a tag-sequence.



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 22 -

These polypeptides, particularly those labelled by an appropriate tag-sequence (for instance a His-tag) or by GST, may be purified by standard affinity chromatography protocols, in particular by using chromatography resins linked to anti-His-tag-antibodies or to anti-GST-antibodies which are both commercially available. Alternatively to the use of

5 anti-tag- or anti-GST-antibodies or other 'label-specific' antibodies the purification may also involve the use of antibodies against said polypeptides. Screening assays that involve a purification step of the recombinantly expressed target genes as described above (step 2) are preferred embodiments of this aspect of the invention.

In a third - optional - step the compounds tested for interaction may be labelled by

10 incorporation of radioactive isotopes or by reaction with luminescent or fluorescent compounds. Alternatively or additionally also the recombinantly expressed polypeptide may be labelled.

In a forth step the recombinantly expressed polypeptide is immobilized to a solid phase, particularly (but not limited) to a chromatography resin. The coupling to the solid phase is

15 thereby preferably established by the generation of covalent bonds.

In a fifth step a candidate chemical compound that might be a potential interaction partner of the said recombinant polypeptide or a complex variety thereof (particularly a drug library) is brought into contact with the immobilized polypeptide.

In a sixth - optional - step one or several washing steps may be performed. As a result just

20 compounds that strongly interact with the immobilized polypeptide remain bound to the solid (immobilized) phase.

In step 7 the interaction between the polypeptide and the specific compound is detected, in particular by monitoring the amount of label remaining associated with the solid phase over background levels.

25

#### **Brief Description of the Drawings**

Fig. 1 shows DIC microscopy images taken from time-lapse recording of the first two rounds of embryonic cell division in wild type *C. elegans*.

Fig. 2 shows DIC microscopy images taken from time-lapse recording of the first two

30 rounds of embryonic cell division in *C. elegans* F1 progeny from F0 parent treated with ds RNA "300C3" or "340G12" directed against gene H38K22.2.

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 23 -

Fig. 3 shows DIC microscopy images taken from time-lapse recording of the first two rounds of embryonic cell division in *C. elegans* F1 progeny from F0 parent treated with dsRNA "307C1" directed against gene C02F5.1.

Fig. 4 shows shows DIC microscopy images taken from time-lapse recording of the first two rounds of embryonic cell division in *C. elegans* F1 progeny from F0 parent treated with ds RNA "305A12" directed against gene F10E9.8.

Fig 5 shows a multiple sequence alignment of the H38K22.2a family. Herein, the amino acid sequences of the two *C. elegans* splice variants H38K22.2a and H38K22.2b are compared to the amino acid sequences of their orthologues in *Drosophila* (CG7427), in mouse (AAF04863) and in homo sapiens (AAH09478).

The "statistics" refer to values that characterize the grade of homology between the individual sequences, as the e-value, the sequence identities and the conservatively changed residues (positives).

15

**Description of the sequence protocol:**

- SEQ ID NO. 1 shows the unspliced DNA sequence common to both isoforms a and b of the *C. elegans* gene H38K22.2 (3104 bp).
- SEQ ID NO. 2 shows the spliced DNA sequence of the *C. elegans* gene H38K22.2a isoform (1011 bp).
- SEQ ID NO. 3 shows the spliced DNA sequence of the *C. elegans* gene H38K22.2b isoform (852 bp).
- SEQ ID NO. 4 shows the unspliced DNA sequence of the *C. elegans* gene C02F5.1 (3308 bp).
- SEQ ID NO. 5 shows the spliced DNA sequence of the *C. elegans* gene C02F5.1 (3033 bp).
- SEQ ID NO. 6 shows the unspliced DNA sequence of the *C. elegans* gene F10E9.8

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 24 -

- (7097 bp).
- SEQ ID NO. 7 shows the spliced DNA sequence of the *C. elegans* gene F10E9.8 (3624 bp).
- SEQ ID NO. 8 shows the deduced amino acid sequence of the *C. elegans* gene H38K22.2a isoform (336 aa).
- 5 SEQ ID NO. 9 shows the deduced amino acid sequence of the *C. elegans* gene H38K22.2b isoform (283 aa).
- SEQ ID NO. 10 shows the deduced amino acid sequence of the *C. elegans* gene C02F5.1 (1010 aa).
- 10 SEQ ID NO. 11 shows the deduced amino acid sequence of the *C. elegans* gene F10E9.8 (1207 aa).
- SEQ ID NO. 12 shows the cDNA sequence of a human orthologue of H38K22.2 (780 bp).
- SEQ ID NO. 13 shows the deduced amino acid sequence of a human orthologue of H38K22.2 (260 aa).
- 15

The following examples illustrate the present invention without, however, limiting the same thereto.

20

#### EXAMPLE 1: Generation of dsRNA molecules for RNAi experiments

First, oligonucleotide primer pair sequences were selected to amplify portions of the gene of interest's coding region using standard PCR techniques. Primer pairs were chosen to yield PCR products containing at least 500 bases of coding sequence, or a maximum of

25

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 25 -

coding bases for genes smaller than 500 bases. In order to permit the subsequent use of the PCR product as a template for *in vitro* RNA transcription reactions from both DNA strands, the T7 polymerase promoter sequence "TAATACGACTCACTATAGG" was added to the 5' end of forward primers, and the T3 polymerase promoter sequence "AATTAAACCCTCACTAAAGG" was added to the 5' end of reverse primers. The synthesis of oligonucleotide primers was completed by a commercial supplier (Sigma-Genosys, UK or MWG-Biotech, Germany).

PCR reactions were performed in a volume of 50  $\mu$ l, with Taq polymerase using 0.8  $\mu$ M primers and approximately 0.1  $\mu$ g of wild-type (N2 strain) genomic DNA template. The PCR products were EtOH precipitated, washed with 70% EtOH and resuspended in 7.0  $\mu$ l TE. 1.0  $\mu$ l of the PCR reaction was pipetted into each of two fresh tubes for 5  $\mu$ l transcription reactions using T3 and T7 RNA polymerases. The separate T3 and T7 transcription reactions were performed according to the manufacturer's instructions (Ambion, Megascript kit), each diluted to 50  $\mu$ l with RNase-free water and then combined. The mixed RNA was purified using RNeasy kits according to the manufacturer's instructions (Qiagen), and eluted into a total of 130  $\mu$ l of RNase-free H<sub>2</sub>O. 50  $\mu$ l of this was mixed with 10  $\mu$ l 6X injection buffer (40 mM KPO<sub>4</sub> pH 7.5, 6 mM potassium citrate, pH 7.5, 4% PEG 6000). The RNA was annealed by heating at 68°C for 10 min, and at 37°C for 30 min. Concentration of the final dsRNAs were measured to be in the range of 0.1-0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l. The products of the PCR reaction, of the T3 and T7 transcription reactions, as well as the dsRNA species were run on 1% agarose gels to be examined for quality control purposes. Success of double stranding was assessed by scoring shift in gel mobility with respect to single stranded RNA, when run on non-denaturing gels.

25

#### EXAMPLE 2: Injections of dsRNA and phenotypic assays

dsRNAs were injected bilaterally into the syncitial portion of both gonads of wild-type (N2 strain) young adult hermaphrodites, and the animals incubated at 20°C for 24 hrs. Embryos were then dissected out from the injected animals and analyzed by time-lapse

30

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 26 -

differential interference contrast videomicroscopy for potential defects in cell division processes, capturing 1 image every 5 seconds, as previously described (Gönczy *et al.*, Dissection of cell division processes in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo by mutational analysis. *J Cell Biol* 144, 927-946 (1999)). For each experiment, embryos  
5 from at least 3 different injected worms were filmed in this manner, from shortly after fertilization until the four cell stage. Embryos from 2 additional injected worms were also recorded via still images, thus yielding phenotypic documentation for at least 5 injected worms in each experiment.

In some cases, embryos exhibited acute sensitivity to osmotic changes, as evidenced by  
10 their loss of structural integrity during the dissection of the injected animals. In order to overcome this limitation, injected animals were not dissected, but rather, anaesthetized for 10 min in M9 medium containing 0.1% tricaine and 0.01% tetramisole, and mounted intact on an agarose pad to observe the F1 embryogenesis *in utero* (Kirby *et al.*, *Dev. Biol.* 142, 203-215 (1990)). The resolution achieved by viewing through the body wall does not equal  
15 that achieved by observing dissected embryos, and only limited phenotypic analysis was conducted in these cases.

Three injected animals were also transferred to a fresh plate 24 hrs after injection of dsRNA, and left at 20°C. Two days later, the plate was checked with a stereomicroscope (20-40x total magnification) for the presence of F1 larvae (L2's-L4's), as well as their  
20 developmental stage. Two days after that, the plate was inspected again for the presence of F1 adults, as well as their overall body morphology and the presence of F2 progeny.

#### EXAMPLE 3: Characterization of the *C. elegans* gene H38K22.2

25 Two dsRNAs, "300C3" and "340G12", were designed and used to specifically silence the expression of the *C. elegans* gene H38K22.2 by RNAi, thereby testing its functional involvement in the first 2 rounds of embryonic cell division in this metazoan species. The dsRNAs were synthesized *in vitro* from PCR-amplified wild type genomic DNA fragments  
30 of the H38K22.2 gene. For the PCR, two sets of primer pairs were used:

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 27 -

- "TCAATCAGTATGTCGACCC" with "GGAAGAAATTGGGGAACA" as forward and reverse primers, respectively, to generate dsRNA "300C3", and "ATCGAGCGCCTCTTCAATC" with "TGGTGTCTCCATTGCTGA" as forward and reverse primers, respectively, to generate dsRNA "340G12". The dsRNAs were purified, and injected into adult hermaphrodite worms. The phenotypic consequences of the RNAi treatment were documented 24 hours later in the F1 progeny of injected worms, using time-lapse differential interference contrast (DIC) microscopy. Embryo recordings started ~20 minutes after fertilisation, while the female pronucleus is completing its meiotic divisions, until the 4 cell stage, ~30 minutes later.
- 10 In the F1 progeny of control worms that were either not injected, or injected with irrelevant dsRNA, the cellular events of the first two rounds of embryonic cell division were found to exhibit very limited variability, as observed by DIC microscopy. All processes that were examined and scored for the possibility of phenotypic deviations are listed and illustrated in Figure 1. Briefly, the antero-posterior polarity of the embryo is initially determined by the position of the male pronucleus at the cortex, shortly after entry into the egg (right arrow in Fig. 1a). This is accompanied by a clear, coordinated flow of yolk granules through the central portion of the cytoplasm along the embryo's longitudinal axis towards the male pronucleus, and a concomitant series of cortical waves or ruffles progressing towards the anterior of the embryo (left side in Fig.1). Shortly thereafter, the male and female pronuclei undergo highly patterned migrations (right and left arrows respectively, in Fig. 1a,b) resulting in their meeting within the posterior half of the embryo (Fig. 1c), followed by a centration and rotation (Fig. 1d) of the pronuclear pair and associated centrosomes (arrowheads in Fig. 1b-d) to set up the future mitotic spindle along the embryo's longitudinal axis. After synchronous breakdown of the pronuclear envelopes, the clearly bipolar mitotic spindle is initially short (Fig. 1e), but then elongates while exhibiting clear lateral "rocking" movements of the posterior pole (Fig. 1f-h). These movements are accompanied by a slight posterior displacement of the posterior spindle pole, while the anterior spindle pole remains approximately stationary. This then results in an asymmetric positioning of the spindle during anaphase and telophase, thereby yielding an asymmetric placement of the cytokinetic furrow (arrowheads in Fig. 1i,j), and generating unequally-sized daughter cells: a smaller posterior P1 blastomere (right cell in Fig. 1k-o), and larger anterior AB blastomere (left cell in Fig. 1k-n). While the AB nucleus

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 28 -

then migrates directly to the center of the AB cell (left arrow in Fig. 1k-l), the P1 nucleus typically migrates further towards the posterior of that cell (right arrow in Fig. 1k-l), before undergoing a pronounced 90° rotation while re-migrating to the anterior P1 cortex with one of its duplicated centrosomes leading (arrowheads in Fig. 1m). This insures that the P1 blastomere then divides along the embryo's longitudinal axis, perpendicular to that of the AB blastomere (Fig. 1n, arrowheads indicate centrosomes). These two divisions occur asynchronously, with P1 lagging 2-3 minutes behind AB (Fig. 1 n-p).

In the F1 embryos of worms injected with dsRNAs "300C3" or "340G12", the following highly reproducible phenotypes are observed (Fig. 2). First, although the dynamics of female pronuclear migration appear normal in all cases, its initiation is often somewhat delayed. Meeting and apposition of the two pronuclei also typically exhibits defects in that the female pronucleus gets captured by only one of the two centrosomes associated with the male pronucleus (compare Fig. 2a-c with Fig. 1a-c). Although this defect is usually corrected before pronuclear envelope breakdown is completed, subsequent positioning of the mitotic spindle within the embryo often appears defective. Weak manifestation of this phenotype appears as a lack of rocking of the posterior spindle pole during anaphase, while more severe cases show a notable drift of the entire spindle towards the posterior or lateral cortex, reaching the cortex itself and losing its longitudinal alignment completely. In the latter cases, the strongly aberrant spindle position gives rise to inappropriate specification of cleavage furrow formation, leading to anomalous cytokinesis. Even in cases where spindle position appears relatively normal, positioning of the daughter Nucleus-Centrosomes-Complexes (NCCs) typically appears abnormal as soon as anaphase ends and the cleavage furrow ingresses. This is often particularly visible in the AB blastomere, where the NCC, instead of moving directly to the centre of the cell starting at telophase, first migrates anteriorly in close proximity to the lateral cortex before eventually centering (Fig. 2a-k). This defect is usually accompanied by an apparent absence of interzonal spindle microtubules at telophase and a notable bifurcation or forking of the cytokinetic cleavage furrow (arrows in Fig. 2 g), leading to aberrantly-sized daughter blastomeres or even failure of cytokinesis by complete regression of the furrow (Fig. 2g-m). Nuclear migration and positioning of the P1 nucleus is also aberrant in most cases, resulting in a significant delay - or in some cases, a complete failure - in achieving its expected 90° rotation and association with the anterior cortex. Division of the P1 blastomere is often

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 29 -

significantly delayed in such embryos. Finally, defects in female meiotic divisions are also occasionally observed, as evidenced by the presence of multiple female pronuclei, indicating a failure to successfully extrude one or both polar bodies, which could come from cytokinetic defects similar to those noted above.

- 5 All observed phenotypes indicate a requirement for H38K22.2 gene function in the microtubule-dependent cellular positioning of NCCs and spindles during mitosis, and possibly meiosis. Since this function is essential to cell cycle progression and cell division throughout metazoans, this gene and any homologues and derivatives thereof represent excellent tools for use in the development of a wide range of therapeutics including anti-proliferative agents. Analysis of the H38K22.2 gene sequence reveals clear orthologues in
- 10 human (NCBI Accession # AAH09478), mouse (NCBI Accession # AAF04863) and *Drosophila* (NCBI Accession # CG7427) (see Fig. 5), all of which have had no known functions ascribed to them until now. Based on their extremely high level of sequence conservation at the protein level, it can be concluded that all of these genes most likely
- 15 encode proteins with equivalent functions in each of their respective species. The 336 residue protein encoded by the H38K22.2 gene isoform "a" exhibits no known structural motifs or consensus domains, according to either SMART or CDD analyses.

#### 20 EXAMPLE 4: Characterization of the *C. elegans* gene C02F5.1

- A dsRNA, "307C1", was designed and used to specifically silence the expression of the *C. elegans* gene C02F5.1 by RNAi, thereby testing its functional involvement in the first 2 rounds of embryonic cell division in this metazoan species. The dsRNA was synthesized *in*
- 25 *vitro* from a PCR-amplified wild type genomic DNA fragment of the C02F5.1 gene. For the PCR, oligonucleotides with sequences "ATCTGAAGATCCGTCCACT" and "ATGCACAATGGGTATTTTT" were used as forward and reverse primers, respectively, to generate dsRNA "307C1" which was purified, and injected into adult hermaphrodite worms. The phenotypic consequences of the RNAi treatment were documented 24 hours
- 30 later in the F1 progeny of injected worms, using time-lapse differential interference contrast (DIC) microscopy. Embryo recordings started ~20 minutes after fertilisation,



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 30 -

while the female pronucleus is completing its meiotic divisions, until the 4 cell stage, ~30 minutes later.

In the F1 progeny of control worms that were either not injected, or injected with irrelevant dsRNA, the cellular events of the first two rounds of embryonic cell division were found to exhibit very limited variability, as observed by DIC microscopy. All processes that were examined and scored for the possibility of phenotypic deviations are listed and illustrated in Figure 1.

F1 embryos from parent worms injected with dsRNA "307C1" are consistently found to exhibit the following phenotypes (Fig. 3). First, all cellular processes that are scorable by DIC microscopy until entry into mitosis are typically indistinguishable from the wild type pattern. These include egg shape and size, yolk granule size and density, yolk granule flows and cortical ruffling, pseudo-cleavage furrow formation and positioning, pronuclear appearance (arrows in Fig. 3a) and migration (Fig. 3a,b), as well as centration and rotation of pronuclei (Fig. 3b,c) and associated pair of centrosomes (arrowheads in Fig. 3b,c). Formation and positioning of the bipolar mitotic spindle also take place normally, but the spindle is most often thinner and less rigid than in wild type, exhibiting aberrant lateral bending during its rocking and elongation at anaphase (Fig. 3f-i). After completion of cytokinesis, which appears normal, the reforming daughter nuclei are typically tear-shaped, and remain close to the newly-formed cortex for a prolonged period (Fig. 3a and k). Consistent with the tear shape, the two nuclei remain often physically connected by anomalous chromatin bridges and karyomeres are also typically seen (asterisks in Fig. 3k and l). This phenotype subsequently results in embryonic lethality in all cases.

The absence of defects in pronuclear migration and assembly of the bipolar spindle argue against a role for this gene in more general microtubule functions. The observed defects are consistent with a failure in mitotic chromosome segregation, most likely in the separation of sister chromatids, resulting in the formation of chromatin bridges, which then persist at telophase. The present data therefore indicate an essential requirement for C02F5.1 gene function in mitotic chromosome segregation. Since this function is essential to cell cycle progression and cell division throughout metazoans, this gene and any

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 31 -

homologues and derivatives thereof represent excellent tools for use in the development of a wide range of therapeutics including anti-proliferative agents.

Analysis of the C02F5.1 sequence reveals that the encoded 1010 residue protein contains regions predicted to form coiled coil structures, i.e. likely protein-protein interaction domains. Sequence homology analyses using the BLASTp program presently reveal no clearly orthologous sequences in other organisms. However, considering the essential and highly conserved nature of the cellular process in question, functional orthologues of this gene/protein are extremely likely to exist in all metazoans, possibly in all eukaryotes, and will be identified using for example the methodology as outlined in EXAMPLE 6.

10

#### EXAMPLE 5: Characterization of the *C. elegans* gene F10E9.8

15

Two dsRNAs, "305A12" and "341G5", were designed and used to specifically silence the expression of the *C. elegans* gene F10E9.8 by RNAi, thereby testing its functional involvement in the first 2 rounds of embryonic cell division in this metazoan species. The dsRNAs were synthesized *in vitro* from PCR-amplified wild type genomic DNA fragments of the F10E9.8 gene. For PCR, two sets of primer pairs were used: "TTCGTCTCGAACACGTATATCCT" with "GAAAGAAGATGAATCAGGCATTG" as forward and reverse primers, respectively, to generate dsRNA "305A12", and "CTGCAAAAATTATGACTGTGTGCG" with "AGCATTGAGATTGGTTGTCC" as forward and reverse primers, respectively, to generate dsRNA "341G5". The dsRNA was purified, and injected into adult hermaphrodite worms. The phenotypic consequences of the RNAi treatment were documented 24 hours later in the F1 progeny of injected worms, using time-lapse differential interference contrast (DIC) microscopy. Embryo recordings started ~20 minutes after fertilisation, while the female pronucleus is completing its meiotic divisions, until the 4 cell stage, ~30 minutes later.

30 In the F1 progeny of control worms that were either not injected, or injected with irrelevant dsRNA, the cellular events of the first two rounds of embryonic cell division were found to

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 32 -

exhibit very limited variability, as observed by DIC microscopy. All processes that were examined and scored for the possibility of phenotypic deviations are listed and illustrated in Figure 1.

In the F1 embryos of worms injected with dsRNAs "305A12" or "341G5", the following highly reproducible phenotypes are observed (Fig. 4). First, all cellular processes that are scorable by DIC microscopy until the 2-cell stage are typically indistinguishable from the wild type pattern. These include egg shape and size, yolk granule size and density, yolk granule flows and cortical ruffling, pseudo-cleavage furrow formation and positioning, pronuclear appearance (arrows in Fig. 4a) and migration (Fig. 4a,b), as well as centration and rotation of pronuclei (Fig. 4b,c) and associated pair of centrosomes (arrowheads in Fig. 4b,c). The first round of division also occurs without any detectable deviations from wild type (Fig. 4d-h). It should particularly be noted that no defects are observed with respect to size, number or positioning of centrosomes or spindle poles in the single cell embryo (note arrowheads in Fig. 4b-f). In the two-cell stage embryo, however, although nuclear positioning also remains equivalent to wild type, an apparent failure in centrosome duplication is consistently observed in one of the two blastomeres and sometimes in both. A single perinuclear centrosomal region, as seen by its exclusion of yolk granules (black arrowhead in Fig. 4h-j), is typically observed instead of the two normally seen both in wild type embryos and in the unaffected blastomere (white arrowheads in Fig. 4i,j). Despite the apparent failure in centrosome duplication, microtubule-dependent processes continue normally, as illustrated by the successful anterior migration of the P1 nucleus, with its single centrosomal region leading (black arrowhead in Fig. 4h-j). Upon entering mitosis, as scored by nuclear envelope breakdown, the defective blastomere then fails to generate a bipolar spindle, forming instead a monopolar array of microtubules (dashed circle in Fig. 4k), as evidenced by the radial alignments of yolk granules in that region. Cytokinesis fails to occur in that blastomere, resulting in reformation of multiple, irregularly sized nuclei, known as karyomeres (arrows in Fig. 4m,n). In contrast, all aspects of cell division occur normally in the neighboring blastomere, resulting in normal daughter cells, each containing a single equal-sized nucleus (arrows in Fig. 4l).

The complete failure in bipolar spindle formation, accompanied by the presence of a single centrosomal region instead of two in the affected two-cell stage blastomere, clearly

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 33 -

indicates a requirement for F10E9.8 gene function in the complex process of mitotic spindle assembly. However, the lack of detectable defects in other microtubule-dependent processes including pronuclear migration and spindle function in the single-cell embryo effectively rules out a general microtubule-related function. In view of the maternal nature  
5 of the RNAi effect and the fact that the egg inherits its first centrosome paternally, the successful generation of a bipolar spindle in the single-cell embryo further suggests that F10E9.8 function may, in fact, be required for some aspect of centrosome duplication or separation.

Indeed, since sperm development is fully completed within the parent before initiation of the RNAi treatment, it remains unaffected by the injected dsRNA. This results in the  
10 donation of an intact "wild type" centrosome from the sperm to the egg at fertilisation. After fertilisation, this already bipartite centrosome (i.e. containing two "replication units", as evidenced by the presence of two centrioles) undergoes one round of duplication, as observed in other systems by the budding of a new centriole barrel from each existing  
15 centriole. This is followed by a physical separation of the two centriole pairs and associated pericentriolar material. This process is not dependent on the prior duplication event, and is solely needed to insure the successful formation of the bipolar spindle to be used in the first round of embryonic cell division. It therefore appears that F10E9.8 function is most likely not required for this process.

20 5. If the first duplication round fails, however, bipolar spindle formation is expected to fail during the second round of division, as seen here. Interestingly, the fact that this failure often occurs only in one of the two blastomeres suggests that in these cases only one of the original centrosome's two "replication units" actually failed in its first round of duplication at the single-cell stage. This observation is consistent with findings from other eukaryotes  
25 indicating that one of the two replication units contained within the sperm's centrosome actually comes into the egg already fully equipped for one duplication round, while the other must rely on cytoplasmic factors within the egg to permit its own duplication (Sluder, G., Hinchcliffe EH. Control of centrosome reproduction: the right number at the right time. *Biol. Cell.* 91, 413-27 (1999).

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 34 -

The present findings therefore suggest that the requirement for F10E9.8 function in mitotic spindle assembly most likely results from this gene's essential role in the process of centrosome duplication.

- 5 Since the process of spindle assembly is essential to cell cycle progression and cell division throughout metazoans, this gene and any homologues and derivatives thereof represent excellent tools for use in the development of a wide range of therapeutics including anti-proliferative agents. Analysis of the F10E9.8 sequence reveals that the encoded 1207  
10 residue protein contains one large region predicted to form coiled coil structures, i.e. likely protein-protein interaction domains, and four predicted transmembrane domains. Sequence homology analyses using the BLASTp program presently reveal no clearly orthologous sequences in other organisms. However, considering the essential and highly conserved nature of the cellular process in question, functional orthologues of this gene/protein are extremely likely to exist in all metazoans, possibly all eukaryotes, and will be identified  
15 using for example the following methodology.

#### EXAMPLE 6: Protocol for identifying functional orthologues in other species

- 20 The present invention describes genes identified as having essential functions in cell division in the model organism *C. elegans*. The basis for performing research in model organisms is that the newly discovered functions for the genes in *C. elegans* will be conserved in other species including humans. Cell division is highly conserved during evolution and therefore the approach of discovering a gene function in *C. elegans* and  
25 using the information to characterise or assign functions for the human orthologue is well justified. There are two themes of conservation of genes during evolution. A gene sequence may be conserved. This means that the DNA nucleotide sequence of the gene is very similar in different species, which in turn suggests that the function of the gene is the same in the different species. As is known to any person skilled in the art, a sequence  
30 identity or homology above a particular level defines that two genes in different species code for the same gene product and gene function. Homologous genes are typically

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

- 35 -

identified by performing blast analysis with appropriate software, or by other approaches. For a blast search, an e-value of  $10^{-30}$  will extract the significant homologous sequences. Further phylogenetic analysis can be performed to identify which of the extracted sequences are the orthologues.

- 5 Therefore the following example for identification of orthologues can be presented. A blast search is performed using the blast sequence analysis programs and an e-value of  $10^{-3}$ . An alternative parameter can be the percentage of sequence identity. Over 100 residues, a sequence identity of 30% defines a homologous gene. After the blast search is completed, multiple sequence alignment is performed using appropriate software (for example,
- 10 CLUSTALW) and a neighbour joining phylogenetic tree is generated. Any person skilled in the art can identify the human orthologue from a phylogenetic tree. Essentially, the human sequence that is separated on the tree by a single speciation event or most closely related on the tree is likely to be an orthologue.

- The second theme of conservation is that the gene function can be conserved with greater
- 15 divergence of sequence. In the present invention this theme of conservation is not defined. However, if other genes are discovered to have functions that result in the gene product being identified as the same gene product as those claimed in the present invention then the present claims also apply to such genes.

**Claims**

1. An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide functionally involved in cell  
5 division and proliferation or a fragment thereof and comprising a nucleic acid  
sequence selected from the group consisting of:
  - (a) the nucleic acid sequences presented in SEQ ID NO. 1 to 3, SEQ ID NO. 4 to 5,  
SEQ ID NO. 6 to 7, SEQ ID NO. 12 and fragments thereof and their  
complementary strands,
  - 10 (b) nucleic acid sequences encoding polypeptides that exhibit a sequence identity with  
SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 or SEQ ID NO.  
13 of at least 25 % over 100 residues and/or which are detectable in a computer  
aided search using the blast sequence analysis programs with an e-value of at most  
10<sup>-30</sup>,
  - 15 (c) nucleic acid sequences which are capable of hybridizing with the nucleic acid  
sequences of (a) or (b) under conditions of medium/high stringency,
  - (d) nucleic acid sequences which are degenerate as a result of the genetic code to any  
of the sequences defined in (a), (b) or (c).
2. A nucleic acid probe comprising a nucleic acid sequence as defined in claim 1 which  
20 may be a polynucleotide or an oligonucleotide comprising at least 15 nucleotides  
containing a detectable label.
3. A recombinant vector or nucleic acid construct having incorporated therein the  
isolated nucleic acid molecule of claim 1 or a fragment thereof.
- 25 4. The vector of claim 3 which is an expression vector.
5. A host cell which has been genetically engineered to incorporate therein the isolated  
nucleic acid molecule of claim 1 or the recombinant vector or nucleic acid construct of  
claim 3.
- 30 6. The host cell of claim 5 having incorporated therein the expression vector of claim 4.

WO 02/38805

37

PCT/EP01/13034

7. An assay kit comprising the isolated nucleic acid molecule or a fragment thereof of claim 1 or the probe of claim 2 in a suitable container.
- 5 8. A method for producing a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation or a fragment thereof in a host cell comprising the steps
- (a) transferring the expression vector of claim 4 into a suitable host cell, and
- (b) cultivating the host cells of step (a) under conditions which will permit the expression of said polypeptide or fragment thereof and
- 10 (c) optionally, secretion of the expressed polypeptide into the culture medium.
9. Use of a probe as defined in claim 2 to isolate orthologues of genes comprising the nucleic acid sequences as disclosed in SEQ ID NO. 1 to 3, SEQ ID NO. 4 to 5, SEQ ID NO. 6 to 7, SEQ ID NO. 11.
- 15 10. Use of the isolated nucleic acid molecule or a fragment thereof as defined in claim 1 for producing a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation or a fragment thereof.
- 20 11. Use of a nucleic acid molecule or a fragment thereof as defined in claim 1 or of the probe of claim 2 in a screening assay for interacting drugs that inhibit, stimulate or effect the cell division or proliferation.
12. Use of a nucleic acid molecule as defined in claim 1 or of the probe of claim 2 in a
- 25 method for diagnosis or treatment of diseases associated with anomalous and/or excessive cell division or proliferation.
13. The use of claim 12 wherein the disease is a coronary restenosis or a neoplastic disease selected from the group consisting of lymphoma, lung cancer, colon cancer, ovarian cancer and breast cancer.
- 30



14. A polypeptide functionally involved in cell division and proliferation or a fragment thereof comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- 5 (a) the amino acid sequences depicted in SEQ ID NO. 8, 9, 10, 11 and 13 and fragments thereof;
- (b) amino acid sequences which exhibit a sequence identity with the sequences of (a) of at least 25 % over 100 residues and/or which are detectable in a computer aided search using the BLAST sequence analysis programs with an e-value of at most  $10^{-30}$ ,
- 10 (c) amino acid sequences encoded by any of the nucleic acid sequences (c) – (d) as defined in claim 1.
15. A fusion protein comprising the polypeptide or fragment thereof of claim 14.
- 15 16. An antibody or a fragment thereof capable of specifically binding with the polypeptide of claim 14 or with an immunogenic part thereof.
17. A humanized antibody capable of specifically binding with the polypeptide of claim 14 or with an immunogenic part thereof.
- 20 18. An assay kit comprising the polypeptide as claimed in claim 14, the fusion protein as claimed in claim 15, or the antibodies as claimed in claims 16 and/or 17 in a suitable container.
19. Use of the polypeptide of claim 14, of the fusion protein of claim 15, or of the antibodies of claims 16 or 17 in a screening assay for interacting drugs that inhibit, stimulate or effect the cell division or proliferation.
- 25 20. The use of a polypeptide or of an antibody as claimed in claim 19 wherein the screening assay for interacting drugs comprises the following steps:

WO 02/38805

39

PCT/EP01/13034

1. recombinant expression of said polypeptide in a host cell
  2. isolation and optionally purification of the recombinantly expressed polypeptide of step 1
  3. optionally labelling of the drugs that are tested to interact with said polypeptide and/or labelling of the recombinantly expressed polypeptide
  4. immobilization of the recombinantly expressed polypeptide to a solid phase
  5. binding of a potential interaction partner or a variety thereof to the polypeptide
  6. optionally one or more washing steps
  7. detection and/or quantification of the interaction, in particular by monitoring the amount of label remaining associated with the solid phase over background levels.
- 
21. Use of the polypeptide of claim 14, of an amino acid sequence as defined in claim 14 or of the antibodies of claims 16 or 17 in a method for diagnosis or treatment of diseases associated with anomalous and/or excessive cell division or proliferation.
- 
22. The use of claim 20 wherein the disease is a coronary restenosis or a neoplastic disease selected from the group consisting of lymphoma, lung cancer, colon cancer, ovarian cancer and breast cancer.
- 
22. Use of the nucleic acid sequences as defined in claim 1 or the amino acid sequences as defined in claim 14 for developing computational models, structural models or other models for evaluating drug binding and efficacy.

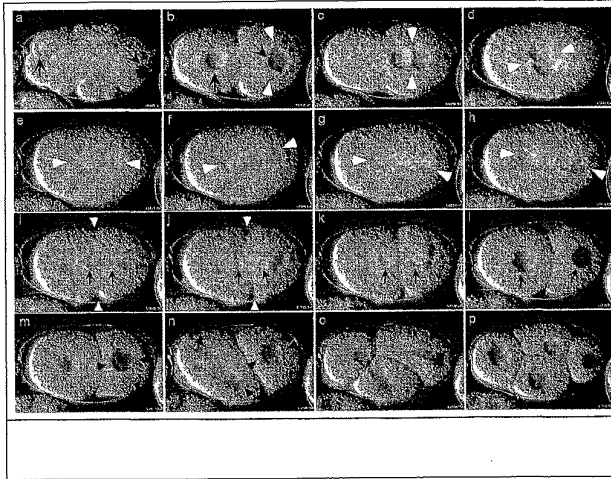


FIG. 1

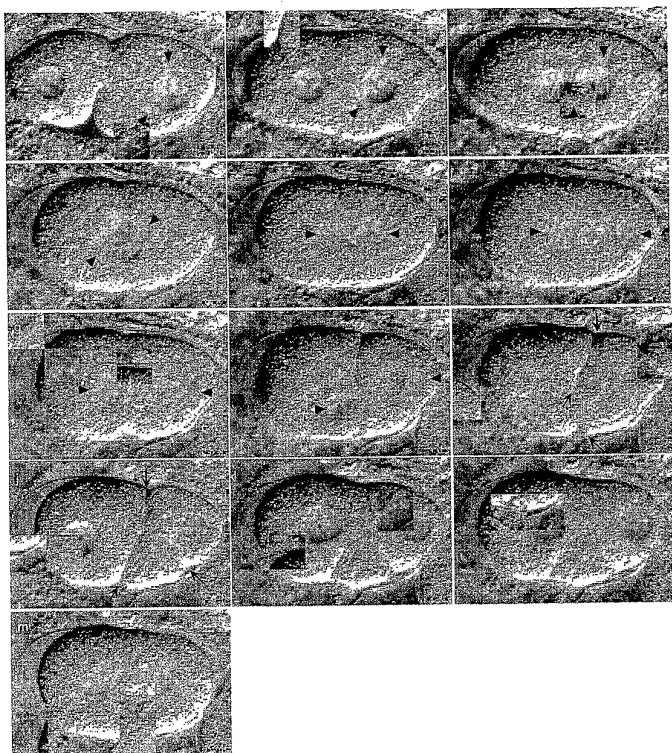


FIG. 2

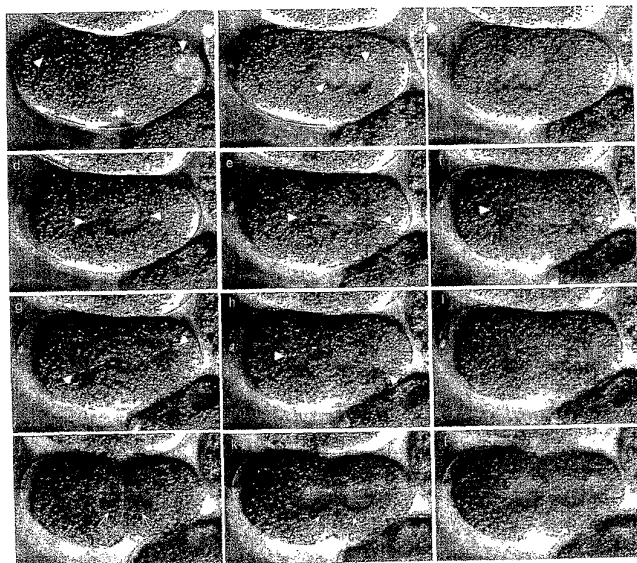


FIG. 3

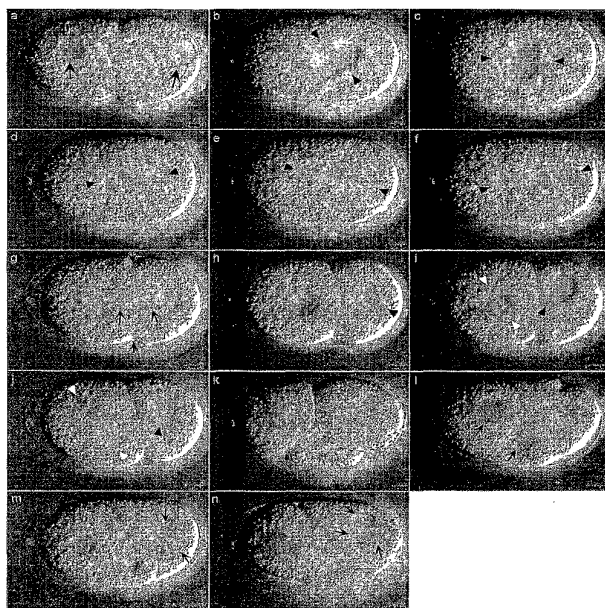


FIG. 4

WO 02/38805

44

PCT/EP01/13034

## Multiple Sequence Alignment of the H38K22.2a family

```

CeH38K22.2a  ---MNLKLS-DQETLLKQVGVWVQVTHAVSINFLAKANMILYEMLYEDKMLFAGSTP
CeH38K22.2b  ---MNLKLS-DQETLLKQVGVWVQVTHAVSINFLAKANMILYEMLYEDKMLFAGSTP
DmCG7427     MILCNLKLSTHDFRVLKELSLHTGKOTAEPCDQNDKFLSDNNYQSEYYEYRE--
MmAA04863    ---MNLKLS-SQDKVYKQEMIFQSSSEKTAVSCHSQNDKFLVETDNTFQHELYIRESV
HsAAH09478    ---MNLKLS-SQDKVYKQEMIFQSSSEKTAVSCHSQNDKFLVETDNTFQHELYIRESV

CeH38K22.2a  QPSNDSMLERIPNOYVDEKVKVGEKMGPHGINRLITDQYEATDRRLVLAWEETPOT
CeH38K22.2b  ---MNLKLS-DQETLLKQVGVWVQVTHAVSINFLAKANMILYEMLYEDKMLFAGSTP
DmCG7427     LDKRKELLMFNRKDESD---FLRTSSQSLHFLDDLDKSDSKMLLQANAKHREVS
MmAA04863    KGSNPKTKHGGTYTKDEQD---EWLSTIDGQQFCDDALDPASISGLLAAVKEBPAT
HsAAH09478    KGSNPKTKHGGTYTKDEQD---ENKSTIDGQQFCDDALDPASISGLLAAVKEBPAT

CeH38K22.2a  QCESLDEWVKMTAQADTVONRQKQDSDINSGLSESKAKTHHLILPARNYAKSAACRN
CeH38K22.2b  QCESLDEWVKMTAQADTVONRQKQDSDINSGLSESKAKTHHLILPARNYAKSAACRN
DmCG7427     QCEFRDRIFFINGCDLGIDSDKLTLEPILQELN-DAGKFKBPVHTFNRYADPGQKG
MmAA04863    QCEFRKQHFMDHTEFGCSIEKLLHAGPRMEQELK-EPGRKDFPQSTNFAANPGQKG
HsAAH09478    QCESKQHFMDHTEFGCSIEKLLHAGPRMEQELK-EPGRKDFPQSTNFAANPGQKG

CeH38K22.2a  LQLETAFCDDNDEFGQSTIMTONIDFWAQNAAASRLAQNVCASNKQFKSVWISREK
CeH38K22.2b  LQLETAFCDDNDEFGQSTIMTONIDFWAQNAAASRLAQNVCASNKQFKSVWISREK
DmCG7427     LQLEMAIAYKQSLSGKPKFLDLCQPEEKHKRAIS-----RDT
MmAA04863    LQLEMAIAYKQSLSGKPKFLDLCQPEEKHKRSIP-----RDT
HsAAH09478    LQLEMAIAYKQSLSGKPKFLDLCQPEEKHKRSIP-----RDT

CeH38K22.2a  WNLFWHILLKFPDLSDFDEGAWFLDDVDFYCRFNLAYPKPGNASNDQOMETPKIAQ
CeH38K22.2b  WNLFWHILLKFPDLSDFDEGAWFLDDVDFYCRFNLAYPKPGNASNDQOMETPKIAQ
DmCG7427     WNLILLDFATNIDDRMSNKQSEGANPFLDDVEWQENDHLEKSSPASGYQQSSASSS
MmAA04863    WNLILLDESSMIADDMSNQDEGAWFLDDVDFYCRFNLAYPKPGNASNDQOMETPKIAQ
HsAAH09478    WNLILLDESSMIADDMSNQDEGAWFLDDVDFYCRFNLAYPKPGNASNDQOMETPKIAQ

CeH38K22.2a  KKPGLFYFNSNLQLIEFKLFQYFMILKTIKTIHTAGTNR
CeH38K22.2b  KKPGLFYFNSNLQLIEFKLFQYFMILKTIKTIHTAGTNR
DmCG7427     SKWNISSAYQTSHTNNNG-----
MmAA04863    -----
HsAAH09478    -----

```

Statistics	HsAAH09478	MmAA04863	DmCG7427
	E-value: 1e-49	E-value: 7e-49	E-value: 6e-44
	Identities: 101/275 (36%)	Identities: 100/275 (36%)	Identities: 104/299 (36%)
CeH38K22.2a	Positives: 158/275 (56%)	Positives: 157/275 (56%)	Positives: 154/299 (56%)
	E-value: 1e-45	E-value: 1e-45	E-value: 2e-35
	Identities: 95/216 (36%)	Identities: 95/216 (36%)	Identities: 95/238 (36%)
CeH38K22.2b	Positives: 119/216 (34%)	Positives: 117/216 (35%)	Positives: 122/238 (35%)

FIG. 5

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Cenix BioScience GmbH

<120> Eukaryotic cell division genes and their use in diagnosis and treatment of proliferative diseases

<130> CE61773US

<150> US 60/246,750

<151> 2000-11-09

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3104

<212> DNA

<213> C. elegans

<400> 1  
atgaatcgac tgaagtcgac tcaaaaaaca aaggtttgta aacggaaaca agacgatgaa 60  
gtggagatga gtgatatgga aactgatcac aaaaagtgtg gaaaacaaga aaacagtaaa 120  
tttgtgcgtg tgaaaattcc attcgtcatc cattcccggt tttctctttt tcagcattta 180  
tctcgagcaa gttcgagttc tctagctcaa agcactgttc tttctgacat ttttcccaag 240  
aactacgata atatcgtgag ttgtagcggg aatttcgaaa aaaaaactaa ttttgccaca 300  
tcttgctgct tcgttttgta tttcttgact agacaaatc tagctcatct agaaagctga 360  
cttttctcaa aatcgttgcg agacccaaag cagaaaaatg tatctttttt aaatctacgt 420  
ggaaacgcgc tccaatatta aatttcgagg ttttcccgcc aaatacctaa cgagacccaa 480  
ctttggcgag cagagcgttt tgcccgcgat tttcctgcgt ctctcaaac aatctaata 540  
ctgctgctgg tttatgaaat atcaattttc ctcatTTTTT aaagctgagc aatgttttcg 600  
ctcaatccta aaatttttag tagttctaata tgtgatcaac ggtttcccat ttcogatcga 660  
agtcaactttt taaattctca cttttattga tttttttcgt tttgaaattc ctgatttctt 720  
cctttttagt gataagacat cagttgctga ctgtagagaa agtgtgagaa actgttagtg 780  
agagagagaa aacagtttga gaaaatgaaa aatgttttaa ataatgatat cataattatt 840  
atttgatacc atttcagct ccggcagttc gtccagtga ctcaggtcac ggaagctgtg 900



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

tctctcaact tcctggcaaa agctaattgg aatatcgaat acgcgatgac tctgtatttc 960  
gacaatccta atctttttgc tggatcgaca ccacagccga gcgttgatag gtccaatgta 1020  
cggcaattgc tgactttggc aactctacag aatgataatg ttctcacaat atttttaatt 1080  
aaaatttagt tatatttaga ctatagaaaa aatatttgat ttatctgaaa atacatttta 1140  
tttcagttgg aataattgga aaagtgcctc caaataattg tttttgagcg cttttttaat 1200  
tggtccaact gaaatcaaag ccattttcag ataaagcaaa tttttttaaa gtatatcact 1260  
aagttttaat tctaaaaaag tattgggaga acatgtcaca ccgactcatt ttgttgaatt 1320  
gccgacaatt gcagaattta aatttaatta tgtaataaaa agtaattttt gtagatcgag 1380  
cgctcttca atcagtatgt cgaccaaaag gataaaggag gagaaaaacg aatgggaccc 1440  
cacggaatca atcgtttgct cactgatctt ggctatgaag ctactgatcg ccgggttctt 1500  
gtgctcgctc ggaagtttac tgcacagaca caatgtgaat tctcgttgga tgaatgggtg 1560  
aaaggaatga cagctcttca agcggatact gttcaaaatt tgagacaacg aatcgattcg 1620  
attaattcag gactggaato ggataaggca aaagtacgga aaaaattaaa taactggaat 1680  
tatcttccaa acttatttga aagtgggaga gcgaatttgc actttttaag aacaaattca 1740  
cgcaaaacac tgtaaatgga agttaattga aaaaatttga tgtaaaatac agagaaaaat 1800  
tacacacttt tctcagga gtacacgggc tgcgtaaatc aacacatagc ttattgttg 1860  
gttcacacca cggcagtatg ataataaaa aaaaatttta attgaaaaat tgaatttaag 1920  
atggaggaaa atgttatttc gatctgaaa taatatttat ttttgtgaaa attaataaat 1980  
ataatttca gaccgaagga aaattttaat acgtttctat aataatttcc gattcaaaaa 2040  
tttgaattat cacaattttt aaaaacaaaa aggttctacg atcgtctcat atetaatc 2100  
ttatcagtta cagttccacg agctctacct atttgccttc aactatgcca aatccgcgcg 2160  
ttgccgaat ctggatcttg aaactgccat ctgttgctgg gatgttcttt tcggacaacg 2220  
atcaacaatt atgactcaat ggatcgattt tctatgggca caggagaacg cggcggcgtc 2280  
tcgctcgctc cagaacgtgg gcgcttccaa tgcgaagcaa ttcaaatcgg tgtggatctc 2340  
tcgtgacacg tggaatctct tctgggactt tattcttctg agtaagccag atttgtcgga 2400  
ttacgatgat gaaggagcat ggccagtgct tattgatcaa ttcgttgatt attgccgtga 2460

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

```

aatctcaat tatccaaagc caggaaatgc gtcaaatgat cagcaaatgg agacaccaag 2520
ttattattag gacaaacaat tctaaaatcc taaagggtcg tgtttcccca attttctcct 2580
attttcagag ttataaaata ttgcctggac gcgaaatgtt gcttcaaaac tacggtagcca 2640
ggctctcgga cgacaaatat tgggttaaatg cgaatgca cgcgccttca atgggtactg 2700
tagtttcaca cttttcaaaa cgttaatttt tctatgaca cagataagct ttaaaaaatc 2760
ttgtgaaaaa cttcaaaaaa tcaaaagttt gaaggcgac atattttaac aaaaaatgtt 2820
tcgtgccgag accggctacc gtatttttta tgcgaaatgt cgcgtttgtg taatattttt 2880
atattatacc gagaaaactc gacactttaa aggtgtggta gcgaattggg attttatttc 2940
gaaaaatata ctaaatatcc caaattcag aaatagcgca aaagaaacc ggaatttttt 3000
attttaattc taatttcaa ctaatagaat tcaaattgtt tcagtatccc atgtcaaga 3060
ctatcttcaa aataacaatt cacaccgcg gaacaaatcg ataa 3104

```

```

<210> 2
<211> 1011
<212> DNA
<213> C. elegans

```

```

<400> 2
atgaatcgac tgaagtccga tcaaaaaaca aagctccggc agtcgtcca gtggactcag 60
gtcacggaag ctgtgtctct caacttcctg gcaaaagcta attggaatat cgaatacgcg 120
atgactctgt atttcgacaa tcctaattct tttgctggat cgacaccaca gccgagcggt 180
gataggtcca atatgagcg cctottcaat cagtatgtcg acccaaagga taaagtggga 240
gaaaaacgaa tgggacccca cggaatcaat cgtttgtcca ctgactctgg ctatgaagct 300
actgacgcc ggggtcttgt gtcgcctgg aagtttactg cacagacaca atgtgaattc 360
tcgttgatg aatgggtgaa aggaatgaca gctcttcaag cggatactgt tcaaaatttg 420
agacaacgaa tcgattcgat taattcagga ctggaatcgg ataaggcaaa attccacgag 480
ctctacctat ttgccttcaa ctatgccaaa tccgccgctt gccgcaatct ggatcttgaa 540
actgccatct gttgctggga tgttcttttc ggacaacgat caacaattat gactcaatgg 600
atcgatttct tatgggcaca ggagaacgcg gcggcgcttc gcctcgctca gaacgtgggc 660
gcttccaatg cgaagcaatt caaatcgggt tggatctctc gtgacacgtg gaatctcttc 720

```

Seite 3

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

```
tgggacttta ttcttctgag taagccagat ttgtcggatt acgatgatga aggagcatgg 780
ccagtgccta ttgatcaatt cgttgattat tgccgtgaaa atctcaatta tccaaagcca 840
ggaaatgcgt caaatgatca gcaaatggag acacccaaaa tagcgcaaaa gaaaccggga 900
attttttatt ttaattotaa tttaacta atagaattca aattgtttca gtatcccatg 960
ctcaagacta tcttcaaaat aacaattcac accgccggaa caaatcgata a 1011
```

<210> 3  
<211> 852  
<212> DNA  
<213> C. elegans

```
<400> 3
atgaatcgac tgaagtccga tcaaaaaaca aagatcgagc gcctcttcaa tcagtatgtc 60
gacccaaagg ataaagttag agaaaaacga atgggacccc acggaatcaa tcgtttgctc 120
actgatcttg gctatgaagc tactgatcgc cgggttcttg tgctcgccct gaagtttact 180
gcacagacac aatgtgaatt ctcggttgat gaatgggtga aaggaatgac agctcttcaa 240
gcggatactg ttcaaaattt gagacaacga atcgattcga ttaattcagg actggaatcg 300
gataaggcaa aattccacga gctotaccta ttgacctca actatgcca atccgccgct 360
tgccgcaatc tggatcttga aactgccatc tgttgctggg atgttctttt cggacaacga 420
tcaacaatta tgactcaatg gatcgatctt ctatgggcac aggagaacgc ggcggcgtct 480
cgccctcgctc agaacgtggg cgcttccaat gcgaagcaat tcaaatcggg gtggatctct 540
cgtgacacgt ggaatctctt ctgggacttt attctcttga gtaagccaga ttgtcggat 600
tacgatgatg aaggagcatg gccagtgcct attgatcaat tcgttgatta ttgccgtgaa 660
aatctcaatt atccaaagcc aggaatgacg tcaaatgac agcaaatgga gacacccaaa 720
atagcgcaaa agaaacccgg aattttttat tttaattcta atttacaact aatagaatc 780
aaattgtttc agtatccat gctcaagact atcttcaaaa taacaattca caccgccgga 840
acaaatcgat aa 852
```

<210> 4  
<211> 3308  
<212> DNA

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

&lt;213&gt; C. elegans

```
<400> 4
atgtc gatgg agcctcgtaa gaagcggaa tcgattctca aggtgcggca agccgtcgaa 60
accatcgagg aaaccgtcat gaacagtggg cctagtcca caacaactaa tcgacgagtc 120
agctttcata acgtgaagca tgtcaagtca gttagagtca gtgaataatt tatcaataaa 180
ataattatct caggcagtat gacagggacc atggtaaaat tcttgacgcc acaccagtta 240
aggagaagat tactgcacct attggatcag atgggtatctt gacgtgagtt ccatccttta 300
acgtgaaata atgaatcgt aaaaatcttt ttaagaccac gtggcggaac catggatatt 360
tccgaatctc cggcctgcac gtctctattt caagtgttcg gcggtggtta tctcgataaa 420
actatggata tgtctctcga aacaactatc aacgagaaca acgaaacggc gagattgttt 480
gaaaccacaa gagatccaac actattatac gaaaagatcg tcgaaaccac aacaaaagtt 540
accgagcgaa ttgttagtat gccactggat gataccttag caatgttcaa tacaacgaat 600
caagaagata aggatatgtc agttgatcgt tcagttcttt tcacgattcc caaagttccg 660
aagcataacg ctacaatgaa tagaactata ccgatggacc tcgatgaatc aaaagcagcg 720
ggcggccagt gcgatgaaac ggtatgttga attaatagaa ggaaccaaatt tatcttaatt 780
ttacagatga atgtgttcaa ttccacaaac ttggaagccg ctgaaatgga tacgagtaaa 840
ttagatgaaa ataataccat gaatgctatc cggattccga ttaattcaaa cgtcatgcct 900
gtagacatgg acatcactga acatcacact ttaattgaag aaaagaaaaa tgatacatc 960
gggccaagtc aactgatgga catttcggcg ccacaagttc aagttaatga tactttggcc 1020
atcttcaaca gtccgagaga catctgtaat aagggttttg gtgttcctca gaatctaata 1080
aatatcgctt cgaacgtcgt acctgtggac atggacatca ctgatcaggc cgtattaaac 1140
gcggagaaga aaaatgatca attcgagaca agtcagctta tggacatttc tattccgaaa 1200
gttctagtaa atgacactat ggcgatgttc aacagcccga aacacgtcag taagagcagc 1260
atggatctcg agaaaacgat tgaagccgct gacaaatcaa cgaaatacco gagtatcgca 1320
gatgaggtgg aagatttga catggatatg gatatactg aacaacaacc atgtgaggct 1380
ggtaatcagc agaacgacgg cttgcaactt caaaaggagg atttaatgga catttcgggt 1440
attcgagatt cacctgcagt aaacgacacc atggctgtgt tccagagtc tgccagagta 1500
```

Seite 5

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

aagatcggag cggtaaagttt taagcacact ttccaataaa aatgtatttc tttcagaaca 1560  
actcgatcat tgattcgag aaatctatcg tgttcggtga cgaaatgagc attgacgaga 1620  
cacaaaatga tggaaaccttg acgttgccaa agtcgaatgt agaagtgact acaactaatg 1680  
atgtctacac gtctctcgag cggcaagagg aaaatgcttc agaaaacgta tccatgataa 1740  
acgaatcttc tgttcattcg gaaatcgaca aaaagtcgtt tatgctcacc gaagaagaaa 1800  
gggcttttat gcaactcctcc atgattgatg tagcacaaaa gttggaagac gatggttcgt 1860  
cgaagacgcc agtcacacct gcttcacagt cagcttctct tgcactaaa gaacatcag 1920  
cccttcacaa ctcgagtgca actctcaaca attcgatgga attggacaac aatactcttc 1980  
ttaaaactat gcaaatatac acgtgtgaag acattagcat ggtccatgag tctattgctg 2040  
ttgaactgaa cagtaacaaa gagcaggagc aattcggaga tgagactttg cagaaaaatg 2100  
gtaaatttcg tttattoaat aactctatta aaagtatgtt ttagatacct cgaatactgg 2160  
cggaatttc acattccaag gccataatga aacatcgcaa atcatgaaca atgtcgactc 2220  
ggaagcagtg aacacgtcca agatttcaac atattcggct ttcaattga gcatcaacca 2280  
gtctatctct aaacgacgtc gatctcttct gaattctgct cgtgaatctc ctgctcgtgt 2340  
tgcgttgagg aattctataa tgcgatgaa tgggcaaaaca atggaagctc tgacagaata 2400  
tcgacagaat aaactatgac agacgagtca agattcgatg ccgagtatga gtttgaacga 2460  
ttcgggaaga gatattctcg cgatggtaag aatatctctt tgagtattga atcgaaaatg 2520  
tctttcagaa tacatcagtc cgctctctc atctgaattc ttcaaaaact gctgcccag 2580  
gaacaccatc attgatgtca caaaatgtac aacttccacc tccatctcct caattcgaaa 2640  
tgccagactt cgatccagct gtgtcaacg ttgtatattt aacatctgaa gatccgtcca 2700  
ctgaacaaca tccagaagct ctcaaattc agcgtattgt tgaacacgag aaaatgaaag 2760  
tacaacacga gattgattct ctgaattcaa ccaatcaact ttctgctgag aaaattgata 2820  
tgttgaagac taaggagctc ttgaagtta gtcgatgga gcgagaagcg attatgattg 2880  
caagaaaaa cgcggaatc aagtttttg agcttcgtct gaaatttga ctogagaaaa 2940  
aaattgaaag tgaccaggaa attgctgaac tagaacaagg aaattcgaaa atggctgagc 3000  
agctaagagg tctcgataag atggctgtcg ttcaaaaaga actagaaaag ctgagaagtc 3060

Seite 6

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

ttctctccatc acgcgaagag agcgggaaaa tccgaaagga gtggatggag atgaagcaat 3120  
gggaattcga ccagaaaaatg aaagcactcc gaaatgtacg ctcaaacatg attgcacttc 3180  
gttcagagaa aaatgctctc gaaatgaaag tcgcggaaga acacgagaag ttgtcccaga 3240  
ggaacgattt gaagaaaagt cgaatgctgg tgttctctaa ggctgttaag aaaattgtga 3300  
acttctag 3308

<210> 5  
<211> 3033  
<212> DNA  
<213> C. elegans

<400> 5  
atgtcgtgg agcctcgtaa gaagcggaac tcgattctca aggtgcggca agccgtcgaa 60  
accatcgagg aaaccgtoat gaacagtggg cctagtcca caacaactaa tcgacgagtc 120  
agctttcata acgtgaagca tgtcaagcag tatgacaggg accatggtaa aattcttgac 180  
gccacaccag ttaaggagaa gattactgac actattggat cagatgggat ttgacacca 240  
cgtggcgga acatggatat ttccgaatct cgggcctgca cgtcctcatt tcaagtgttc 300  
ggcgggtgta atctcgataa aactatggat atgtctctcg aaacaactat caacgagaac 360  
aacgaaacgg cgagattgtt tgaaccaca agagatccaa cactattata cgaaaagatc 420  
gtcgaaacca caacaaaagt taccgagcga attgttagta tgccactgga tgatacctta 480  
gcaatgttca atacaacgaa tcaagaagat aaggatatgt cagttgatcg ttcagttctt 540  
ttcacgattc ccaaagtccc gaagcataac gctacaatga atagaactat accgatggac 600  
ctcgatgaat caaaagcagc gggcgccag tgcatgaaa cgatgaatgt gttcaatttc 660  
acaaacttgg aagccgctga aatggatacg agtaaattag atgaaaataa taccatgaat 720  
gctatccgga ttccgattaa ttcaaactgc atgcctgtag acatggacat cactgaacat 780  
cacactttaa ttgaagaaaa gaaaaatgat acattcgggc caagtcaact gatggacatt 840  
tcggcgccac aagttcaagt taatgatact ttggccattt tcaacagtc gagagacatc 900  
tgtaataagg gtttgggtgt tcctcagaat ctaataaata tcgcctcgaa cgtcgtaact 960  
gtggacatgg acatcactga tcaggccgta ttaaaccgag agaagaaaaa tgatcaattc 1020

Seite 7

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

gagacaagtc agcttatgga catctctatt ccgaaagttc tagtaaatga cactatggcg 1080  
atgttcaaca gcccgaaaca cgtcagtaag agcagcatgg atctcgagaa aacgattgaa 1140  
gccgctgaca aatcaacgaa ataccgaggt atcgagatg aggtggaaga ttagacatg 1200  
gatatggata tcaactgaaca acaacctgtg gaggtctgga atcagcagaa cgacggcttg 1260  
caacttcaaa aggaggattt aatggacatt tcggtgattc gagattcacc tgcagtaaac 1320  
gacaccatgg ctgtgttcca ggtcctgcc agagtaaaga tcggagcgaa caactcgatc 1380  
attgattcgc agaaatctat cgtgttcggt gacgaaatga gcattgacga gacacaaaat 1440  
gatggaacct tgacgttgcc aaagtogaat gtagaagtga ctacaactaa tgatgtctac 1500  
acgtctctcg agcggcaaga ggaatatgct tcagaaaacg tatccatgat aaacgaatct 1560  
tctgttcatt cggaaatcga caaaaagtcg tttatgtcga tcgaagaaga aagggtcttt 1620  
atgcactcct ccattgattga ttagtcacaa aagttggaag acgatgggtc gtcgaagacg 1680  
ccagtcaccc ttgcttcaca gtcagcttct ctgtccacta aagaaccatc agcccttcac 1740  
aactcgagtg caactctcaa caattcgatg gaattggaca acaatactct tcttaaaact 1800  
atgcaaatga caacgtgtga agacattagc atggtccatg agtctattgc tgttgaactg 1860  
aacagtaaca aagagcagga gcaattcgga gatgagactt tgcagaaaaa tgatacctcg 1920  
aatactggcg cgaatttcac attccaagcg cataatgaaa catcgcaaat catgaacaat 1980  
gtcgactcgg aagcagtga cagtcgaag atttcaacat attcggtttt caatttgagc 2040  
atcaaccagt ctatctctaa acgacgtcga tctcttctga attctgctcg tgaatctct 2100  
cgtcgtgttg cgttgagaga ttctataatg tcgatgaatg ggcaacaat ggaagctctg 2160  
acagaatcgc gacagaataa aactatgcag acgagtcag attcgatgcc gagtatgagt 2220  
ttgaacgatt cgggaagaga tattctcgcg atgaatacat cagtcgctc tctcatctg 2280  
aattcttcaa aaactgctgc ccaggaaca ccattcattga tgcacaaaaa tgtacaactt 2340  
ccactccat ctctcaatt cgaatgccga gacttcgatc cagctgtggt caacgttgta 2400  
tatttaacat ctgaagatcc gtccactgaa caacatccag aagctctcaa atttcagcgt 2460  
attgttgaaa acgagaaaat gaaagtacaa cagcagattg attctctgaa ttcaaccaat 2520  
caactttctg ctgagaaaaa tgatatgttg aagactaagg agctcttgaa gtttagtcat 2580

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

gatgagcgag aagcgattat gattgcaaga aaagacgcgg aaatcaagtt tttggagctt 2640  
cgtctgaaat ttgcactcga gaaaaaaatt gaaagtgacc aggaaattgc tgaactagaa 2700  
caaggaaatt cgaaaatggc tgagcagcta agaggtctcg ataagatggc tgcgttcaa 2760  
aaagaactag aaaagctgag aagtcttctt ccatcacgcg aagagagcgg gaaaatccga 2820  
aaggagtggg tggagatgaa gcaatgggaa ttcgaccaga aaatgaaagc actccgaaat 2880  
gtacgctcaa acatgattgc acttcgttca gagaaaaatg ctctcgaaat gaaagtcgcg 2940  
gaagaacacg agaagtttgc ccagaggaac gatttgaaga aaagtcgaat gctggtgttc 3000  
tctaaggctg ttaagaaaat tgtgaacttc tag 3033

<210> 6  
<211> 7097  
<212> DNA  
<213> C. elegans

<400> 6  
accgcatctc ttccaatgga tcaaccatca ttgtcatctt cgccggaaaa tgcgtctaaat 60  
cccgacacctt ccgttgctga agagcatggc cacagtggac agcacgctga agaagaagaa 120  
gacaatgaca cggatgaagt atctgcaatg ccttcttttg tgctctgatga acettcgact 180  
cttgtttaatt cagatcatga attgtctgat gatgctttaa agtataaaaa tgcagctgcc 240  
gaattcaaag cttttgagag aagaatggat tcggtaagaa cagccaaatc agaatgataa 300  
ttgaaatttt acatagaata gatttacgta tcaaaaatca aaacctacga atactctcta 360  
attcaaaatt taattaatta aaattaaaga tgagatcagc ttcaacaatc acaacatcac 420  
tggcaacgcc atcatcttgt gcaccatcaa actcctctga gcctcctact cggctctacac 480  
caattatgaa cgatttaggc gttggcccaa ataatacaca ttggccgtct tcaatgcaag 540  
aattatcagg aatttctctg gaaacaccac aggctcgacc gcttggcagc aatagaatta 600  
atcagcttgg taggttaata acaaaaaaaa catgattgat tagattttta gttcgaagtg 660  
aggctcaaac gggaataagc cttttacaac accatgaaag acctactgtg accgccccat 720  
tgagacgaaa tgatgatgat aactcatcac gacagaatcc acagaatgga aatgttcaag 780  
atgaaaatcg acccgagcac gtttatgato aaccaataca tgttcctgga tcatcactgg 840  
accgacagaa acttgaattt gaaattcgac gtcacgtaa cttgaacata caactgagag 900

Seite 9



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

acactattgc tcacttggat tatgcagaag aatccgtgca caccacaaaa cgacagctcg 960  
aagaaaaaat ttccgaagtc aataatttta agaaagaact gatagaagaa ttaagaaat 1020  
gcaaaaaagg agttgaggaa gaatttgaga agaagtttga gaaaattaag gaagattatg 1080  
atgaacttta cgagaaattg aagagggatc aacgagatct tgaacgagat cagaagatat 1140  
tgaagaaagg aacggggaga aggaataaag aattcacaga aacggtattt aagaatttaa 1200  
gcaagaataa gttattcgag aaaaaccacg aaatttcgat tgaattttt tctcaaagca 1260  
aaatctaaaa ttttcattga aataaattga gaatttaaaa agttgaaatt ctattataaa 1320  
acctttaatt taaaatccag caaaacttgt caaatttcag atagccactc tccgcgacaa 1380  
attaagagca tcagaaacca agaatgcaca atatcgacag gatatactgt ttcgagacga 1440  
aaagctcaag aaaaaagacg aggaatcga gaagcttcag aaagacggaa accggctaaa 1500  
gagcactcta cagactttag aaaagcgcgt aaaacaatta cgtactgaaa aagaacgoga 1560  
cgataaagaa aaggagatgt tcgcgaaggt tgcaatgaat cgaaaaactt cgaatccagt 1620  
gccaccagtt ttgaatcaaa gtgttccaat ttcgataaca tcaaatggtc catctagaca 1680  
tccatcatca tcttcgttga caacatttag aaaaccatct acatcaaato gagaaagagg 1740  
tgttagttgg gcagatgaac caaatgaaca atcattggaa gctgtaccac aggagttttt 1800  
gatggtaata tttgatcaaa agcaggggtt ttttaaaatt gtttttagaa tattgctctg 1860  
aaaaaatcaa ttcaaaaaaa atttcaaatt attttttctt cccgactaaa aaattaatat 1920  
ttttgaaaaa tagtttttta agtctaaaaa tttacagctt actattagca ttgcccga 1980  
gttccgattt ttcaaaaatt ccagaattaa aaatcaatag ttttcgagtt accgaaaatt 2040  
gtcaaaaaaa aatttttaaa catgcttttt gaagatgcca gtcaaaagaa tgccgggaaa 2100  
atttgaaaaa tgcacgatct acagagatto tcttgagaa acatctaaag tgacggatac 2160  
atgtcaacaa tcaccagcca aaaagggata agattattaa ctgagagacg aggggataat 2220  
tccctcatac taactctcac tottactct ctctgctctt ctctcattt gtcttctttt 2280  
tttgatattg gttgtggttt tttgtcaccg aataataaga atgctatgaa tacatctcac 2340  
aattcatttt tctttttctt gcttctcttc cttttttcgt tctttttgcc gtttgccatg 2400  
tgagagtaat aggctgtgaa tgggccagaa ggacactgca caaagtagtc agtcatcaca 2460

Seite 10

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

ggcttttgtt tatgatgaaa gagagacatt gagaagagga aaaagagaag atggaagaaa 2520  
aaggcacaag aagtattcaa ctacatgcac cagagaccct tctcttcttt caactatatg 2580  
ctttcaatat ccatctcatt tttatgatca tcataacttt tgtgctccac gttcggtttt 2640  
aactttgcc agttttaaat tacgttcttc ttgccttcca gttttagaaa ttcagaagct 2700  
ctatagatgt aggactctca taagccacaa atatcgtaac tcttcagaaa accttaaaaa 2760  
tttccgaaat attgttattt gaagaacaca tgtttcaaga catgaaattt gaaaaacgcc 2820  
agaaattccg ttttaccaga aattgaattt atcaattagc tttgaattta tcgatttgtt 2880  
actttcaaaa agccaagatt ttgtacacct agattcgaaa ttttgcgatt ttcgacgagg 2940  
aaatacggta ctttgcgttt aaaaaaacgt aaaattcttt ggataatagt aattcaaacc 3000  
taaaacctaa ataaatttta gatgtttcaa aactttcagt caactttttg gtaaattgcc 3060  
aaatttctaag aaaatgtggg ctttcccagc aattttgagc ataaatgtaa atctaatttc 3120  
tagaaagttg ttagtttttt taatccgaaa aaaaactcgt agaataattt tgttcatttt 3180  
taatagagaa tctccaaaa ttatgataag gactgatatt ttttgacagt gaacaataaa 3240  
atttcaatta aaaaaattat atatctatga taatttgga ttttggcgag aatagtttct 3300  
atcaatttgt ttaactagca aaatacgacc agtttgaaaa ttccattaag acaatccaga 3360  
tactcttgaa atagatatctc tgggaatagt ttcatttgaa aataaacggt atccttttaa 3420  
cgatcaaggc cgttacttat aacttataaa attataattt acaaatagtt atctgcaagt 3480  
atctacocat tgacatcctt atttaactca tttcttcttt tttcttctta caataataat 3540  
aatgtgttca ggatgggtcac agtgatacca aaaataataa gttctccata tctcggaca 3600  
cgctaccac tgtacctcta cactgtttcc atcgtaagaa ttaccaatca atagaaaatt 3660  
caagtttaca cctataattc tagattattt cctgctcttt attatactgg aatcttcttt 3720  
actgcaaaaa ttatgactgt gtcgttgaga aggaatttcg atggggaagt actcggcact 3780  
tactacagg atcatacaat ttggtaccat aaagaaatga cataactttc agtactttcc 3840  
ggtgatagca gctccgatta taatggtaat atcgttttct tggttaataa ttgcaatata 3900  
ttattcaagt agttcatgtg ttcttacatt caattttatg gtaagtttta taggaaggag 3960  
gaataaaaata aatattgaaa ttaaaggaaa tgccatctgc agtactttgt tctctacttg 4020

Seite 11

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

gtgggtattag ttctgtaata gaaattcatt tttccattga agtaaatcaa gttcaatgga 4080  
ctgatcagtg gttactgtca tctgtgggtt taccaatcaa cgattgttta aaaatcgata 4140  
ttttcaggga tcttcaatac ttttatgcct tttacatgct acaattgcgt tcacacttca 4200  
ataatccttc caacatatatt gaatttccaa tcttcttcaa atcgatgtga aaaaacttgt 4260  
atcattgttt ttatcaaata tgaaacattt tataggaatc aaaaatatta tgtgaactgt 4320  
gatatttact cttgtcfaat tcatttcattg taaatattat tttgatactc attactggca 4380  
taaattatat tttcgaaatt catgtcacga gcgcggatga tgagggacaa ttcgaaattaa 4440  
ttctcttttt ctcaacaaaa acaattaaat tttgaacctc cctccgtttt ctttgaaaat 4500  
ggcctagatg tgtgatggcc gtggactagc attttcccta gcacgacggc gggaaattgtc 4560  
tgcgatcatc tcgtcttgca cgtctctctc ttaccccccg ctgtggttat tataccgttt 4620  
accaccttaa tcccttcaaa acgcttttat aatttcacat aatctcttct tagaaatctc 4680  
aatcgtttat tcagatggga aatcgatcaa agacagacaa tgcaactgcc gtggcatcgc 4740  
aaacacccaa aaaagttaaa tcgtaagttt tctttcctat tttcaaaact aatatacttg 4800  
aatcatcaa catttttagg aaaaagcaaa agaaaatgag cttttcaca gcacaagacg 4860  
tatatcttcg tctgaagcaa gaaaaagaag aggagaaaca acgagagcga gccgaacgag 4920  
aaaagcgaaa tgagacgatt gcagcgacaa ataatcaag aaagaagatg aatcaggcat 4980  
tggcaaaaag aaataaaaaa ggacaaccaa atctgaatgc tcaaatggat gtacttctcg 5040  
agaggatata gaaaagagtg gataaggaga aaaaggagaa gaaatgaact aattgttttg 5100  
tcttttata tttcagattt tttttgttga aatgaaattg ttgtgttttt aaaaatcgat 5160  
agttttatcg tttcttcgtt tcttaccgat agtatacttt attttctgaa atataattca 5220  
attatttatt aaaaaccttt tcagccttca gatggcttcc gatgaaaata tcggtgccga 5280  
cggatgaacag aagccttctc ggccgttttt gagaaaagga caaggaacag caagatttag 5340  
aatggtagtt tgtgcaaata caaggcttat cgaaataata tatgaagttc agcctagaaa 5400  
caacaaaaca tctgctggtg cacctccaac gtcggaactt tcactctgct caagtccttc 5460  
tattaatgtt cctaggttta gtctgtcggg aagtaaaata tcttaaatat aaacgttata 5520  
aaactgtggt gactagttaa atataaatat taagtagaat tattocagaa tgctctcccg 5580

Seite 12

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

aactctgccc gaacogtgga cagtgggaata tcaaatgaag acgagaccog tccaccaacc 5640  
aatagctaac ggtcttcttt tcgaatattc caatggagat cttcgatggg ttaatcggca 5700  
gaacgctggt aatgtaagtt ttaattggaa ttttgtcaat taaagtgacc aatttacaga 5760  
tctacatata cgcagttgat aaaacagtca gaattgatct cccacatac aatatttcaa 5820  
ttattcatac atttcaaagg caagttgaag tacttcgtcc tggaaataac ataacattga 5880  
taagtattaa acgacagaaa gtgcgaactg atttgattta tcaaacgga atgtataaaa 5940  
ctgaaatgta agattatttt ctttttttaa gtcatcgga aatttcgtat ttcagcttca 6000  
atagggacgg aagatatgtt acgaaggatt ttagcaatca agaagtttcg agaaagtgag 6060  
tctctattca ttttccaatt aattattcag aaaaaccatt aaaatctcaa aactattacc 6120  
cagatgttta atttaattta atttaattta ttacgataga agatatcgtt aggtagaaaa 6180  
aaaaacacac acacattaat agatacaaac catcacaagt ggttacataa ataaattaca 6240  
taaataaaac gaaacaaaaa taaaaaaga gatgtgacat tttgcggcaa aaaatgtctc 6300  
ggcagcataa aatttagtta aatgggaaaa ggcgtgcgcc tttaaatatt actgtagttt 6360  
aaaaatcgcg ttactgtcga attgttggtt gcccttttt ttttgataa aaacatgttt 6420  
attagtttag aaaaaagata aataaaccaa actacaacag tctttatagg cgcacgtatt 6480  
ttcacattta aaaatctgtc ctttaacgaa aaaattgtaa aatttggcgc cttcaaagag 6540  
tactgtaatt tcaaaactcaa tttgaaacag aattttcatc gattttcctt agttagtttt 6600  
tcgatgaatt ttaattttatt cattaaaaaa actcaaataa gtataacgat attttagcaa 6660  
ataatatatt ttcaacaaa acatgtttct ataatttttg tctaoccaa aatttaggaa 6720  
tatgacctca attcttcaaa aagttagtaa aacaggttta aaaccccggt ataaatattt 6780  
ttgcctctga aacctatcaa attttcagat acaatcccgg tacacacaca tatcgcgaca 6840  
atcaatgtcg ctacgttctc gtcactgatt acaacgattt tgagctcgtt gagccagaat 6900  
tccgtcttcg ttggtatcag ggagatccga ctggtctcaa caatcagtat attctcaaga 6960  
tcattggacg acctgaatgc agcgagaaaa cattgagact tgaagtgaat ctttccacgt 7020  
gtgaaggtag attggaact gcagagatga taggcgataa acgtcggaaa acaactttgt 7080  
tcagtgga aaatga 7097

Seite 13

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

<210> 7  
<211> 3624  
<212> DNA  
<213> C. elegans

<400> 7  
atgtcaacaa tcaccagcca aaaaggata agattattaa ctgagagacg aggggataat 60  
tccctcatac taactctcac tcttcaactct ctctgctctt ctccctcattt gtcttctttt 120  
tttgatattg gttgtggttt ttgtcaccg aataataaga atgctatgaa tacatctcac 180  
aattcatttt tctttttctt gcttctcttc cttttttcgt tctttttgcc gtttgccatt 240  
caactttttg gtaaattgcc aaattctaag aaaatgtggg ctttccagc aattttgagc 300  
ataaatgtaa atctaatttc tagaaagtg atggtcacag tgataccaaa aataataagt 360  
tctccatac ctcggacag cctaccactg tacctctaca ctggttccat cattatttcc 420  
tgctctttat tatactggaa tcttctttac tgcaaaaatt atgactgtgt cgttgagaag 480  
gaatttcgat ggggaagtac tcggcactta ctacagtact ttccggtgat agcagctccg 540  
attataatgg taatatcggtt ttcttggtta ataattgcaa tatattattc aagtagttca 600  
tgtgttctta cattcaattt tatggaaatg ccatctgcag tactttgttc tctacttggg 660  
ggtattagtt ctgtaataga aattcatttt tcattgaag taaatcaagt tcaatggact 720  
gatcagtggt tactgtcatc tgtgggttta ccaatcaacg attgtttaaa aatcgatatt 780  
ttcagggatc ttcaatactt ttatgccttt tacatgctac aattgcgttc acacttcaat 840  
aatccttcca acatatttga atttccaatc ttcttcaaat cgatgaatca aaaatattat 900  
gtgaactgtg atatttactc ttgctcaatt catttcatga aaaagcaaaa gaaaatgagc 960  
ttttcacaag cacaagacgt atatcttcgt ctgaagcaag aaaaagaaga ggagaaacaa 1020  
cgagagcgag cogaacgaga aaagcgaaat gagacgattg cagcgacaaa taaatcaaga 1080  
aagaagatga atcaggcatt ggcaaaaaga aataaaaaag gacaacaaa tctgaatgct 1140  
caaatggata tggcttccga tgaataatc ggtgccgacg gtgaacagaa gccttctcgg 1200  
ccgtttttga gaaaaggaca aggaacagca agatttagaa tggtagtttg tgcaaataca 1260  
aggcttatcg aaataatata tgaagttcag cctagaaaca acaaacatc tgctgggtgca 1320

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CB61773US.ST25

cctccaacgt cggaactttc atctgcttca agtccttcta ttaatgttcc taggtttagt 1380  
ctgtcgaatg ctctcccgaa ctctgccoga accgtggaca gtggaatata aatgaagac 1440  
gagaccgctc caccaaccac cgcactctct ccaatggatc aaccatcatt gtcactcttcg 1500  
ccggaaaaatc gtctaaatcc cgcaccttcc gttgctgaag agcatggcca cagtggacag 1560  
cacgctgaag aagaagaaga caatgacacg gatgaagtat ctgcaatgcc ttcttttctg 1620  
cctgatgaac ctctgactct tgttaattca gatcatgaat tgtctgatga tgcctttaaag 1680  
tataaaaaatc cagctgccga attcaaagct ttgagagaa gaatggatcc gatgagatca 1740  
gcttcaacaa tcacaacatc actggcaacg ccatcatctt gtgcaccatc aaactcctct 1800  
gagcctccta ctcggtctac accaattatg aacgatttag gcgttggccc aaataatcac 1860  
aattggcctg ctcaatgca agaattatca ggaatttctc tggaaacacc acaggtctcga 1920  
ccgcttgga gcaatagaat taatcagctt gttcgaagtg aggtcacaac gggaataagc 1980  
cttttacaac accatgaaag acctactgtg accgccccat tgagacgaaa tgatatgatg 2040  
aactcatcac gacagaatcc acagaatgga aatgttcaag atgaaaaatc acccgagcac 2100  
gtttatgatc aaccaataca tgttcctgga tcatcactgg accgacagaa acttgaaatt 2160  
gaaattcgac gtcactgtaa cttgaacata caactgagag aactatttgc tcaactggat 2220  
tatgcagaag aatccgtgca caccacaaaa cgacagctcg aagaaaaaat ttccgaagtc 2280  
aataatttta agaaagaact gatagaagaa tttaagaaat gcaaaaaagg agttgaggaa 2340  
gaatttgaga agaagtttga gaaaattaag gaagattatg atgaacttta cgagaaattg 2400  
aagagggatc aacgagatct tgaacgagat cagaagatat tgaagaaagg aacgggagaa 2460  
aggaataaag aattcacaga aacgatagcc actctccgag acaaaattaag agcatcagaa 2520  
accaagaatg cacaatatcg acaggatata cgtgttcgag acgaaaagct caagaaaaaa 2580  
gacgaggaaa tcgagaagct tcagaaagac ggaaccggc taaagagcac tctacagact 2640  
ttagaaaaagc gcgtaaaaca attacgtact gaaaaagaac gcgacgataa agaaaaggag 2700  
atgttcgaga aggttgcaat gaatcgaaaa acttcgaatc cagtgccacc agttttgaat 2760  
caaagtgttc caatttcgat aacatcaaat ggtccatcta gacatccatc atcatcttcg 2820  
ttgacaacat ttagaaaacc atctacatca aatcgagaaa gaggtgttag ttgggcagat 2880

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

gaaccaaattg aacaatcatt ggaagctgta ccacaggagt ttttgatgat gccagtcaaa 294  
 gaaatgccgg gaaaattttg aaaatgcacg atctacagag attctcttgg agaaacatct 300  
 aaagtgcagg atacaatagc taacggtctt cttttcgaat attccaatgg agatcttcga 306  
 tgggttaatc ggcagaacgc tgttaatatc tacatatcgg cagttgataa aacagtcaga 312  
 attgatctcc ccacatacaa tatttcaatt attcatacat ttcaaaggca agttgaagta 318  
 cttcgtcctg gaaataacat aacattgata agtattaaac gacgagaagt tcgaactgat 324  
 ttgatttacc aaaacggaat gtataaaact gaaatcttca atagggacgg aagatatgtt 330  
 acgaaggatt ttagcaatca agaagtttgc agaaaataca atcccgttac acacacatat 336  
 cgcgacaatc aatgtcgcga cgttctcgtc actgattaca acgattttga gctcgttgag 342  
 ccagaattcc gtcttcgttg gtatcaggga gatccgactg gtctcaacaa tcagtatat 348  
 ctcaagatca ttggacgacc tgaatgcagc gagaaaacat tgagacttga agtgaatctt 354  
 tccacgtgtg aaggtacatt ggaaactgca gagatgatag gcgataaacg tcggaaaaca 360  
 actttgttcc agtggaaaaa atga 362

<210> 8  
 <211> 336  
 <212> PRT  
 <213> C. elegans

<400> 8

Met Asn Arg Leu Lys Ser Asp Gln Lys Thr Lys Leu Arg Gln Phe Val  
1 5 10 15

Gln Trp Thr Gln Val Thr Glu Ala Val Ser Leu Asn Phe Leu Ala Lys  
20 25 30

Ala Asn Trp Asn Ile Glu Tyr Ala Met Thr Leu Tyr Phe Asp Asn Pro  
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Gly Ser Thr Pro Gln Pro Ser Val Asp Arg Ser Asn  
50 55 60

Ile Glu Arg Leu Phe Asn Gln Tyr Val Asp Pro Lys Asp Lys Val Gly  
65 70 75 80

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Glu Lys Arg Met Gly Pro His Gly Ile Asn Arg Leu Leu Thr Asp Leu  
 85 90 95

Gly Tyr Glu Ala Thr Asp Arg Arg Val Leu Val Leu Ala Trp Lys Phe  
 100 105 110

Thr Ala Gln Thr Gln Cys Glu Phe Ser Leu Asp Glu Trp Val Lys Gly  
 115 120 125

Met Thr Ala Leu Gln Ala Asp Thr Val Gln Asn Leu Arg Gln Arg Ile  
 130 135 140

Asp Ser Ile Asn Ser Gly Leu Glu Ser Asp Lys Ala Lys Phe His Glu  
 145 150 155 160

Leu Tyr Leu Phe Ala Phe Asn Tyr Ala Lys Ser Ala Ala Cys Arg Asn  
 165 170 175

Leu Asp Leu Glu Thr Ala Ile Cys Cys Trp Asp Val Leu Phe Gly Gln  
 180 185 190

Arg Ser Thr Ile Met Thr Gln Trp Ile Asp Phe Leu Trp Ala Gln Glu  
 195 200 205

Asn Ala Ala Ala Ser Arg Leu Ala Gln Asn Val Gly Ala Ser Asn Ala  
 210 215 220

Lys Gln Phe Lys Ser Val Trp Ile Ser Arg Asp Thr Trp Asn Leu Phe  
 225 230 235 240

Trp Asp Phe Ile Leu Leu Ser Lys Pro Asp Leu Ser Asp Tyr Asp Asp  
 245 250 255

Glu Gly Ala Trp Pro Val Leu Ile Asp Gln Phe Val Asp Tyr Cys Arg  
 260 265 270

Glu Asn Leu Asn Tyr Pro Lys Pro Gly Asn Ala Ser Asn Asp Gln Gln  
 275 280 285

Seite 17



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Met Glu Thr Pro Lys Ile Ala Gln Lys Lys Pro Gly Ile Phe Tyr Phe  
 290 295 300

Asn Ser Asn Leu Gln Leu Ile Glu Phe Lys Leu Phe Gln Tyr Pro Met  
 305 310 315 320

Leu Lys Thr Ile Phe Lys Ile Thr Ile His Thr Ala Gly Thr Asn Arg  
 325 330 335

<210> 9  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> C. elegans

<400> 9

Met Asn Arg Leu Lys Ser Asp Gln Lys Thr Lys Ile Glu Arg Leu Phe  
 1 5 10 15

Asn Gln Tyr Val Asp Pro Lys Asp Lys Val Gly Glu Lys Arg Met Gly  
 20 25 30

Pro His Gly Ile Asn Arg Leu Leu Thr Asp Leu Gly Tyr Glu Ala Thr  
 35 40 45

Asp Arg Arg Val Leu Val Leu Ala Trp Lys Phe Thr Ala Gln Thr Gln  
 50 55 60

Cys Glu Phe Ser Leu Asp Glu Trp Val Lys Gly Met Thr Ala Leu Gln  
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Val Gln Asn Leu Arg Gln Arg Ile Asp Ser Ile Asn Ser  
 85 90 95

Gly Leu Glu Ser Asp Lys Ala Lys Phe His Glu Leu Tyr Leu Phe Ala  
 100 105 110

Phe Asn Tyr Ala Lys Ser Ala Ala Cys Arg Asn Leu Asp Leu Glu Thr  
 115 120 125

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Ala Ile Cys Cys Trp Asp Val Leu Phe Gly Gln Arg Ser Thr Ile Met  
 130 135 140

Thr Gln Trp Ile Asp Phe Leu Trp Ala Gln Glu Asn Ala Ala Ala Ser  
 145 150 155 160

Arg Leu Ala Gln Asn Val Gly Ala Ser Asn Ala Lys Gln Phe Lys Ser  
 165 170 175

Val Trp Ile Ser Arg Asp Thr Trp Asn Leu Phe Trp Asp Phe Ile Leu  
 180 185 190

Leu Ser Lys Pro Asp Leu Ser Asp Tyr Asp Asp Glu Gly Ala Trp Pro  
 195 200 205

Val Leu Ile Asp Gln Phe Val Asp Tyr Cys Arg Glu Asn Leu Asn Tyr  
 210 215 220

Pro Lys Pro Gly Asn Ala Ser Asn Asp Gln Gln Met Glu Thr Pro Lys  
 225 230 235 240

Ile Ala Gln Lys Lys Pro Gly Ile Phe Tyr Phe Asn Ser Asn Leu Gln  
 245 250 255

Leu Ile Glu Phe Lys Leu Phe Gln Tyr Pro Met Leu Lys Thr Ile Phe  
 260 265 270

Lys Ile Thr Ile His Thr Ala Gly Thr Asn Arg  
 275 280

<210> 10  
 <211> 1010  
 <212> PRT  
 <213> C. elegans

<400> 10

Met Ser Met Glu Pro Arg Lys Lys Arg Asn Ser Ile Leu Lys Val Arg  
 1 5 10 15

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Gln Ala Val Glu Thr Ile Glu Glu Thr Val Met Asn Ser Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Thr Thr Thr Asn Arg Arg Val Ser Phe His Asn Val Lys His Val  
 35 40 45

Lys Gln Tyr Asp Arg Asp His Gly Lys Ile Leu Asp Ala Thr Pro Val  
 50 55 60

Lys Glu Lys Ile Thr Asp Thr Ile Gly Ser Asp Gly Ile Leu Thr Pro  
 65 70 75 80

Arg Gly Gly Asn Met Asp Ile Ser Glu Ser Pro Ala Cys Thr Ser Ser  
 85 90 95

Phe Gln Val Phe Gly Gly Gly Asn Leu Asp Lys Thr Met Asp Met Ser  
 100 105 110

Leu Glu Thr Thr Ile Asn Glu Asn Asn Glu Thr Ala Arg Leu Phe Glu  
 115 120 125

Thr Thr Arg Asp Pro Thr Leu Leu Tyr Glu Lys Ile Val Glu Thr Thr  
 130 135 140

Thr Lys Val Thr Glu Arg Ile Val Ser Met Pro Leu Asp Asp Thr Leu  
 145 150 155 160

Ala Met Phe Asn Thr Thr Asn Gln Glu Asp Lys Asp Met Ser Val Asp  
 165 170 175

Arg Ser Val Leu Phe Thr Ile Pro Lys Val Pro Lys His Asn Ala Thr  
 180 185 190

Met Asn Arg Thr Ile Pro Met Asp Leu Asp Glu Ser Lys Ala Ala Gly  
 195 200 205

Gly Gln Cys Asp Glu Thr Met Asn Val Phe Asn Phe Thr Asn Leu Glu  
 210 215 220

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Ala Ala Glu Met Asp Thr Ser Lys Leu Asp Glu Asn Asn Thr Met Asn  
 225 230 235 240

Ala Ile Arg Ile Pro Ile Asn Ser Asn Val Met Pro Val Asp Met Asp  
 245 250 255

Ile Thr Glu His His Thr Leu Ile Glu Glu Lys Lys Asn Asp Thr Phe  
 260 265 270

Gly Pro Ser Gln Leu Met Asp Ile Ser Ala Pro Gln Val Gln Val Asn  
 275 280 285

Asp Thr Leu Ala Ile Phe Asn Ser Pro Arg Asp Ile Cys Asn Lys Gly  
 290 295 300

Leu Gly Val Pro Gln Asn Leu Ile Asn Ile Ala Ser Asn Val Val Pro  
 305 310 315 320

Val Asp Met Asp Ile Thr Asp Gln Ala Val Leu Asn Ala Glu Lys Lys  
 325 330 335

Asn Asp Gln Phe Glu Thr Ser Gln Leu Met Asp Ile Ser Ile Pro Lys  
 340 345 350

Val Leu Val Asn Asp Thr Met Ala Met Phe Asn Ser Pro Lys His Val  
 355 360 365

Ser Lys Ser Ser Met Asp Leu Glu Lys Thr Ile Glu Ala Ala Asp Lys  
 370 375 380

Ser Thr Lys Tyr Pro Ser Ile Ala Asp Glu Val Glu Asp Leu Asp Met  
 385 390 395 400

Asp Met Asp Ile Thr Glu Gln Gln Pro Cys Glu Ala Gly Asn Gln Gln  
 405 410 415

Asn Asp Gly Leu Gln Leu Gln Lys Glu Asp Leu Met Asp Ile Ser Val  
 420 425 430

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Ile Arg Asp Ser Pro Ala Val Asn Asp Thr Met Ala Val Phe Gln Ser  
 435 440 445

Pro Ala Arg Val Lys Ile Gly Ala Asn Asn Ser Ile Ile Asp Ser Gln  
 450 455 460

Lys Ser Ile Val Phe Gly Asp Glu Met Ser Ile Asp Glu Thr Gln Asn  
 465 470 475 480

Asp Gly Thr Leu Thr Leu Pro Lys Ser Asn Val Glu Val Thr Thr Thr  
 485 490 495

Asn Asp Val Tyr Thr Ser Leu Glu Arg Gln Glu Glu Asn Ala Ser Glu  
 500 505 510

Asn Val Ser Met Ile Asn Glu Ser Ser Val His Ser Glu Ile Asp Lys  
 515 520 525

Lys Ser Phe Met Leu Ile Glu Glu Arg Ala Phe Met His Ser Ser  
 530 535 540

Met Ile Asp Val Ala Gln Lys Leu Glu Asp Asp Gly Ser Ser Lys Thr  
 545 550 555 560

Pro Val Ile Leu Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Ala Thr Lys Glu Pro  
 565 570 575

Ser Ala Leu His Asn Ser Ser Ala Thr Leu Asn Asn Ser Met Glu Leu  
 580 585 590

Asp Asn Asn Thr Leu Leu Lys Thr Met Gln Ile Thr Thr Cys Glu Asp  
 595 600 605

Ile Ser Met Val His Glu Ser Ile Ala Val Glu Leu Asn Ser Asn Lys  
 610 615 620

Glu Gln Glu Gln Phe Gly Asp Glu Thr Leu Gln Lys Asn Asp Thr Ser  
 625 630 635 640

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Asn Thr Gly Ala Asn Phe Thr Phe Gln Gly His Asn Glu Thr Ser Gln  
 645 650 655  
 Ile Met Asn Asn Val Asp Ser Glu Ala Val Asn Thr Ser Lys Ile Ser  
 660 665 670  
 Thr Tyr Ser Ala Phe Asn Leu Ser Ile Asn Gln Ser Ile Ser Lys Arg  
 675 680 685  
 Arg Arg Ser Leu Leu Asn Ser Ala Arg Glu Ser Pro Arg Arg Val Ala  
 690 695 700  
 Leu Glu Asn Ser Ile Met Ser Met Asn Gly Gln Thr Met Glu Ala Leu  
 705 710 715 720  
 Thr Glu Tyr Arg Gln Asn Lys Thr Met Gln Thr Ser Gln Asp Ser Met  
 725 730 735  
 Pro Ser Met Ser Leu Asn Asp Ser Gly Arg Asp Ile Leu Ala Met Asn  
 740 745 750  
 Thr Ser Val Arg Ser Pro His Leu Asn Ser Ser Lys Thr Ala Ala Pro  
 755 760 765  
 Gly Thr Pro Ser Leu Met Ser Gln Asn Val Gln Leu Pro Pro Pro Ser  
 770 775 780  
 Pro Gln Phe Glu Met Pro Asp Phe Asp Pro Ala Val Val Asn Val Val  
 785 790 795 800  
 Tyr Leu Thr Ser Glu Asp Pro Ser Thr Glu Gln His Pro Glu Ala Leu  
 805 810 815  
 Lys Phe Gln Arg Ile Val Glu Asn Glu Lys Met Lys Val Gln His Glu  
 820 825 830  
 Ile Asp Ser Leu Asn Ser Thr Asn Gln Leu Ser Ala Glu Lys Ile Asp  
 835 840 845

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Met Leu Lys Thr Lys Glu Leu Leu Lys Phe Ser His Asp Glu Arg Glu  
 850 855 860

Ala Ile Met Ile Ala Arg Lys Asp Ala Glu Ile Lys Phe Leu Glu Leu  
 865 870 875 880

Arg Leu Lys Phe Ala Leu Glu Lys Lys Ile Glu Ser Asp Gln Glu Ile  
 885 890 895

Ala Glu Leu Glu Gln Gly Asn Ser Lys Met Ala Glu Gln Leu Arg Gly  
 900 905 910

Leu Asp Lys Met Ala Val Val Gln Lys Glu Leu Glu Lys Leu Arg Ser  
 915 920 925

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Ser Gly Lys Ile Arg Lys Glu Trp Met  
 930 935 940

Glu Met Lys Gln Trp Glu Phe Asp Gln Lys Met Lys Ala Leu Arg Asn  
 945 950 955 960

Val Arg Ser Asn Met Ile Ala Leu Arg Ser Glu Lys Asn Ala Leu Glu  
 965 970 975

Met Lys Val Ala Glu Glu His Glu Lys Phe Ala Gln Arg Asn Asp Leu  
 980 985 990

Lys Lys Ser Arg Met Leu Val Phe Ser Lys Ala Val Lys Lys Ile Val  
 995 1000 1005

Asn Phe  
 1010

<210> 11  
 <211> 1207  
 <212> PRT  
 <213> C. elegans

<400> 11

Met Ser Thr Ile Thr Ser Gln Lys Gly Ile Arg Leu Leu Thr Glu Arg

Seite 25



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

210 215 220

Val Ile Glu Ile His Phe Ser Ile Glu Val Asn Gln Val Gln Trp Thr  
 225 230 235 240

Asp Gln Trp Leu Leu Ser Ser Val Gly Leu Pro Ile Asn Asp Cys Leu  
 245 250 255

Lys Ile Asp Ile Phe Arg Asp Leu Gln Tyr Phe Tyr Ala Phe Tyr Met  
 260 265 270

Leu Gln Leu Arg Ser His Phe Asn Asn Pro Ser Asn Ile Phe Glu Phe  
 275 280 285

Pro Ile Phe Phe Lys Ser Met Asn Gln Lys Tyr Tyr Val Asn Cys Asp  
 290 295 300

Ile Tyr Ser Cys Ser Ile His Phe Met Lys Lys Gln Lys Lys Met Ser  
 305 310 315 320

Phe Ser Gln Ala Gln Asp Val Tyr Leu Arg Leu Lys Gln Glu Lys Glu  
 325 330 335

Glu Glu Lys Gln Arg Glu Arg Ala Glu Arg Glu Lys Arg Asn Glu Thr  
 340 345 350

Ile Ala Ala Thr Asn Lys Ser Arg Lys Lys Met Asn Gln Ala Leu Ala  
 355 360 365

Lys Arg Asn Lys Lys Gly Gln Pro Asn Leu Asn Ala Gln Met Asp Met  
 370 375 380

Ala Ser Asp Glu Asn Ile Gly Ala Asp Gly Glu Gln Lys Pro Ser Arg  
 385 390 395 400

Pro Phe Leu Arg Lys Gly Gln Gly Thr Ala Arg Phe Arg Met Val Val  
 405 410 415

Cys Ala Asn Thr Arg Leu Ile Glu Ile Ile Tyr Glu Val Gln Pro Arg

Seite 26

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

420 CE61773US.ST25 430  
 425 440 445  
 Asn Asn Lys Thr Ser Ala Gly Ala Pro Pro Thr Ser Glu Leu Ser Ser  
 435 440 445  
 Ala Ser Ser Pro Ser Ile Asn Val Pro Arg Phe Ser Leu Ser Asn Ala  
 450 455 460  
 Leu Pro Asn Ser Ala Arg Thr Val Asp Ser Gly Ile Ser Asn Glu Asp  
 465 470 475 480  
 Glu Thr Arg Pro Pro Thr Thr Ala Ser Leu Pro Met Asp Gln Pro Ser  
 485 490 495  
 Leu Ser Ser Ser Pro Glu Asn Arg Leu Asn Pro Ala Pro Ser Val Ala  
 500 505 510  
 Glu Glu His Gly His Ser Gly Gln His Ala Glu Glu Glu Glu Asp Asn  
 515 520 525  
 Asp Thr Asp Glu Val Ser Ala Met Pro Ser Phe Val Pro Asp Glu Pro  
 530 535 540  
 Ser Thr Leu Val Asn Ser Asp His Glu Leu Ser Asp Asp Ala Leu Lys  
 545 550 555 560  
 Tyr Lys Asn Ala Ala Ala Glu Phe Lys Ala Phe Glu Arg Arg Met Asp  
 565 570 575  
 Ser Met Arg Ser Ala Ser Thr Ile Thr Thr Ser Leu Ala Thr Pro Ser  
 580 585 590  
 Ser Cys Ala Pro Ser Asn Ser Ser Glu Pro Pro Thr Arg Ser Thr Pro  
 595 600 605  
 Ile Met Asn Asp Leu Gly Val Gly Pro Asn Asn His Asn Trp Pro Ser  
 610 615 620  
 Ser Met Gln Glu Leu Ser Gly Ile Ser Leu Glu Thr Pro Gln Ala Arg  
 Seite 27

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

625                      630                      635                      640

Pro Leu Gly Ser Asn Arg Ile Asn Gln Leu Val Arg Ser Glu Ala Gln  
645                      650                      655

Thr Gly Ile Ser Leu Leu Gln His His Glu Arg Pro Thr Val Thr Ala  
660                      665                      670

Pro Leu Arg Arg Asn Asp Met Met Asn Ser Ser Arg Gln Asn Pro Gln  
675                      680                      685

Asn Gly Asn Val Gln Asp Glu Asn Arg Pro Glu His Val Tyr Asp Gln  
690                      695                      700

Pro Ile His Val Pro Gly Ser Ser Leu Asp Arg Gln Lys Leu Glu Ile  
705                      710                      715                      720

Glu Ile Arg Arg His Arg Asn Leu Asn Ile Gln Leu Arg Asp Thr Ile  
725                      730                      735

Ala His Leu Asp Tyr Ala Glu Glu Ser Val His Thr Thr Lys Arg Gln  
740                      745                      750

Leu Glu Glu Lys Ile Ser Glu Val Asn Asn Phe Lys Lys Glu Leu Ile  
755                      760                      765

Glu Glu Phe Lys Lys Cys Lys Lys Gly Val Glu Glu Glu Phe Glu Lys  
770                      775                      780

Lys Phe Glu Lys Ile Lys Glu Asp Tyr Asp Glu Leu Tyr Glu Lys Leu  
785                      790                      795                      800

Lys Arg Asp Gln Arg Asp Leu Glu Arg Asp Gln Lys Ile Leu Lys Lys  
805                      810                      815

Gly Thr Gly Glu Arg Asn Lys Glu Phe Thr Glu Thr Ile Ala Thr Leu  
820                      825                      830

Arg Asp Lys Leu Arg Ala Ser Glu Thr Lys Asn Ala Gln Tyr Arg Gln

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

835                      840                      845  
 Asp Ile Arg Val Arg Asp Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Glu Glu Ile  
 850                      855                      860  
 Glu Lys Leu Gln Lys Asp Gly Asn Arg Leu Lys Ser Thr Leu Gln Thr  
 865                      870                      875                      880  
 Leu Glu Lys Arg Val Lys Gln Leu Arg Thr Glu Lys Glu Arg Asp Asp  
 885                      890                      895  
 Lys Glu Lys Glu Met Phe Ala Lys Val Ala Met Asn Arg Lys Thr Ser  
 900                      905                      910  
 Asn Pro Val Pro Pro Val Leu Asn Gln Ser Val Pro Ile Ser Ile Thr  
 915                      920                      925  
 Ser Asn Gly Pro Ser Arg His Pro Ser Ser Ser Ser Leu Thr Thr Phe  
 930                      935                      940  
 Arg Lys Pro Ser Thr Ser Asn Arg Glu Arg Gly Val Ser Trp Ala Asp  
 945                      950                      955                      960  
 Glu Pro Asn Glu Gln Ser Leu Glu Ala Val Pro Gln Glu Phe Leu Met  
 965                      970                      975  
 Met Pro Val Lys Glu Met Pro Gly Lys Phe Gly Lys Cys Thr Ile Tyr  
 980                      985                      990  
 Arg Asp Ser Leu Gly Glu Thr Ser Lys Val Thr Asp Thr Ile Ala Asn  
 995                      1000                      1005  
 Gly Leu Leu Phe Glu Tyr Ser Asn Gly Asp Leu Arg Trp Val Asn  
 1010                      1015                      1020  
 Arg Gln Asn Ala Val Asn Ile Tyr Ile Ser Ala Val Asp Lys Thr  
 1025                      1030                      1035  
 Val Arg Ile Asp Leu Pro Thr Tyr Asn Ile Ser Ile Ile His Thr  
 Seite 29

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

1040                      1045                      1050

Phe Gln Arg Gln Val Glu Val Leu Arg Pro Gly Asn Asn Ile Thr  
 1055                      1060                      1065

Leu Ile Ser Ile Lys Arg Arg Glu Val Arg Thr Asp Leu Ile Tyr  
 1070                      1075                      1080

Gln Asn Gly Met Tyr Lys Thr Glu Ile Phe Asn Arg Asp Gly Arg  
 1085                      1090                      1095

Tyr Val Thr Lys Asp Phe Ser Asn Gln Glu Val Ser Arg Lys Tyr  
 1100                      1105                      1110

Asn Pro Gly Thr His Thr Tyr Arg Asp Asn Gln Cys Arg Tyr Val  
 1115                      1120                      1125

Leu Val Thr Asp Tyr Asn Asp Phe Glu Leu Val Glu Pro Glu Phe  
 1130                      1135                      1140

Arg Leu Arg Trp Tyr Gln Gly Asp Pro Thr Gly Leu Asn Asn Gln  
 1145                      1150                      1155

Tyr Ile Leu Lys Ile Ile Gly Arg Pro Glu Cys Ser Glu Lys Thr  
 1160                      1165                      1170

Leu Arg Leu Glu Val Asn Leu Ser Thr Cys Glu Gly Thr Leu Glu  
 1175                      1180                      1185

Thr Ala Glu Met Ile Gly Asp Lys Arg Arg Lys Thr Thr Leu Phe  
 1190                      1195                      1200

Gln Trp Lys Lys  
 1205

<210> 12  
 <211> 780  
 <212> DNA  
 <213> homo sapiens

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

```

<400> 12
atgaacaagt tgaatcatc gcagaaggat aaagttcgtc agtttatgat cttcacacaa 60
tctagtgaaa aaacagcagt aagttgtctt tctcaaatg actggaagtt agatgttgca 120
acagataatt ttttcaaaa tcctgaactt tatatacgag agagtgtaaa aggatcattg 180
gacaggaaga agttagaaca gctgtacaat agatacaag accctcaaga tgagaataaa 240
attggaatag atggcataca gcagttctgt gatgacctgg cactcgatcc agccagcatt 300
agtggttgta ttattgctg gaagttcaga gcagcaacac agtgcgagtt ctccaaacag 360
gagttcatgg atggcatgac agaattagga tgtgacagca tagaacaact aaaggcccag 420
atacccaaga tggaacaaga attgaaagaa ccaggacgat ttaaggattt ttaccagttt 480
acttttaatt ttgcaagaa tccaggacaa aaaggattag atctagaaat ggccattgcc 540
tactggaact tagtgcttaa tggaagattt aaattcttag acttatggaa taaatttttg 600
ttggaacatc ataaacgatc aataccaaaa gacacttgga atcttctttt agacttcagt 660
acgatgattg cagatgacat gtctaattat gatgaagaag gagcatggcc tgttcttatt 720
gatgactttg tggaatttgc acgcctcaa attgctggga caaaaagtac aacagtgtag 780

```

```

<210> 13
<211> 259
<212> PRT
<213> homo sapiens

```

```

<400> 13

```

```

Met Asn Lys Leu Lys Ser Ser Gln Lys Asp Lys Val Arg Gln Phe Met
1          5          10          15

```

```

Ile Phe Thr Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Val Ser Cys Leu Ser Gln
          20          25          30

```

```

Asn Asp Trp Lys Leu Asp Val Ala Thr Asp Asn Phe Phe Gln Asn Pro
          35          40          45

```

```

Glu Leu Tyr Ile Arg Glu Ser Val Lys Gly Ser Leu Asp Arg Lys Lys
          50          55          60

```

```

Leu Glu Gln Leu Tyr Asn Arg Tyr Lys Asp Pro Gln Asp Glu Asn Lys

```

Seite 31

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

65                      70                      75                      80

Ile Gly Ile Asp Gly Ile Gln Gln Phe Cys Asp Asp Leu Ala Leu Asp  
                                  85                                   90                                   95

Pro Ala Ser Ile Ser Val Leu Ile Ile Ala Trp Lys Phe Arg Ala Ala  
                                  100                                   105                                   110

Thr Gln Cys Glu Phe Ser Lys Gln Glu Phe Met Asp Gly Met Thr Glu  
                                  115                                   120                                   125

Leu Gly Cys Asp Ser Ile Glu Gln Leu Lys Ala Gln Ile Pro Lys Met  
                                  130                                   135                                   140

Glu Gln Glu Leu Lys Glu Pro Gly Arg Phe Lys Asp Phe Tyr Gln Phe  
                                  145                                   150                                   155                                   160

Thr Phe Asn Phe Ala Lys Asn Pro Gly Gln Lys Gly Leu Asp Leu Glu  
                                  165                                   170                                   175

Met Ala Ile Ala Tyr Trp Asn Leu Val Leu Asn Gly Arg Phe Lys Phe  
                                  180                                   185                                   190

Leu Asp Leu Trp Asn Lys Phe Leu Leu Glu His His Lys Arg Ser Ile  
                                  195                                   200                                   205

Pro Lys Asp Thr Trp Asn Leu Leu Leu Asp Phe Ser Thr Met Ile Ala  
                                  210                                   215                                   220

Asp Asp Met Ser Asn Tyr Asp Glu Glu Gly Ala Trp Pro Val Leu Ile  
                                  225                                   230                                   235                                   240

Asp Asp Phe Val Glu Phe Ala Arg Pro Gln Ile Ala Gly Thr Lys Ser  
                                  245                                   250                                   255

Thr Thr Val

&lt;210&gt; 14

Seite 32

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Ser Lys Gln Glu Phe Met Asp Gly Met Thr Glu Leu Gly Cys Asp Ser  
 1 5 10 15

Ile Glu Gln Leu Lys Ala Gln Ile Pro Lys Met Glu Gln Glu Leu Lys  
 20 25 30

Glu Pro Gly Arg Phe Lys Asp Phe Tyr Gln Phe Thr Phe Asn Phe Ala  
 35 40 45

Lys Asn Pro Gly Gln Lys Gly Leu Asp Leu Glu Asp Arg Lys Lys Leu  
 50 55 60

Glu Gln Leu Tyr Asn Arg Tyr Lys Asp Pro Gln Asp Glu Asn Lys Ile  
 65 70 75 80

Gly Ile Asp Gly Ile Gln Gln Phe Cys Asp Asp Leu Ala Leu Asp Pro  
 85 90 95

Ala Ser Ile Ser Val Leu Ile Ile Ala Trp Lys Phe Arg Ala Ala Thr  
 100 105 110

Gln Cys Glu Phe Ser Lys Gln Glu Phe Met Asp Gly Met Thr Glu Leu  
 115 120 125

Gly Cys Asp Ser Ile Glu Gln Leu Lys Ala Gln Ile Pro Lys Met Glu  
 130 135 140

Gln Glu Leu Lys Glu Pro Gly Arg Phe Lys Asp Phe Tyr Gln Phe Thr  
 145 150 155 160

Phe Asn Phe Ala Lys Asn Pro Gly Gln Lys Gly Leu Asp Leu Glu Met  
 165 170 175

Ala Ile Ala Tyr Trp Asn Leu Val Leu Asn Gly Arg Phe Lys Phe Leu  
 180 185 190

Seite 33



WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

Asp Leu Trp Asn Lys Phe Leu Leu Glu His His Lys Arg Ser Ile Pro  
 195 200 205

Lys Asp Thr Trp Asn Leu Leu Leu Asp Phe Ser Thr Met Ile Ala Asp  
 210 215 220

Asp Met Ser Asn Tyr Asp Glu Glu Gly Ala Trp Pro Val Leu Ile Asp  
 225 230 235 240

Asp Phe Val Glu Phe Ala Arg Pro Gln Ile Ala Gly Thr Lys Ser Thr  
 245 250 255

Thr Val

<210> 15  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> T7 polymerase promoter sequence (example 1)

<400> 15  
 taatagcact cactatagg 19

<210> 16  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> T3 polymerase promoter sequence

<400> 16  
 aattaaccct cactaaagg 19

<210> 17  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

<223> oligonucleotide for PCR amplification (example 3)  
 <400> 17  
 tcaatcagta tgtcgaccc 19  
  
 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide for PCR amplification (example 3)  
  
 <400> 18  
 ggaagaaatt ggggaaca 19  
  
 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide for PCR amplification (example 3)  
  
 <400> 19  
 atcgagcgcc tcttcaatc 19  
  
 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide for PCR amplification (example 3)  
  
 <400> 20  
 tgggtgtctcc atttgotga 19  
  
 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> oligonucleotide for PCR amplification (example 4)  
  
 <400> 21  
 atctgaagat ccgtccact 19

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

<210> 22  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide for PCR amplification (example 4)

<400> 22  
atgcacaatg ggtattttt 19

<210> 23  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide for PCR amplification (example 5; forward  
primer to generate dsRNA 305A12)

<400> 23  
ttcgtctcga acacgtatat cct 23

<210> 24  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide for PCR amplification (example 5; reverse  
primer to generate dsRNA 305A12)

<400> 24  
gaaagaagat gaatcaggca ttg 23

<210> 25  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> oligonucleotide for PCR amplification (example 5; forward  
primer to generate dsRNA 341G5)

<400> 25  
ctgcaaaaat tatgactgtg tcg 23

WO 02/38805

PCT/EP01/13034

CE61773US.ST25

<210> 26  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
  
<220>  
<223> oligonucleotide for PCR amplification (example 5; reverse  
primer to generate dsRNA 341G5)  
  
<400> 26  
agcattcaga ttggttgtc c 21

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
16 May 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/038805 A3**(51) International Patent Classification: C07K 14/435,  
A61K 38/17, G01N 33/566(74) Agent: ISENBRUCK, Günter, Bardehle Pagenberg Dost  
Allenburg Geissler Isenbruck, Theodor-Heuss-Anlage 12,  
68165 Mannheim (DE).

(21) International Application Number: PCT/JP01/13034

(22) International Filing Date:  
9 November 2001 (09.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/246,750 9 November 2000 (09.11.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): CENIX  
BIOSCIENCE GMBH [DE/DE]; Ploienhauerstrasse 108,  
01307 Dresden (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ECHEVERRI,  
Christophe [FR/DE]; Schlossberg 10a, 69117 Heidelberg  
(DE). GOENCZY, Pierre [CH/CH]; 10, avenue de la  
Harpe, CH-1007 Lausanne (CH). HYMAN, Anthony  
[GB/DE]; Hölderlinweg 14, 69120 Heidelberg (DE).  
JONES, Steven [GB/CA]; 600 West 10th Avenue, Van-  
couver, British Columbia V5Z 4E6 (CA). OEGEMA,  
Karen [US/DE]; Schlossberg 10b, 69117 Heidelberg (DE).  
KIRKHAM, Matthew [GB/DE]; Ladenburgerstrasse 57,  
69120 Heidelberg (DE).

Published:

— with international search report  
with sequence listing part of description published sepa-  
rately in electronic form and available upon request from  
the International Bureau(88) Date of publication of the international search report:  
13 February 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/038805 A3

(54) Title: EUKARYOTIC CELL DIVISION GENES AND THEIR USE IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PROLIFERA-  
TIVE DISEASES(57) Abstract: The present invention relates to the significant functional role of several *C. elegans* genes and of their corresponding  
gene products in cell division and proliferation processes that could be identified by means of RNA-mediated interference (RNAi)  
and to the identification and isolation of functional orthologues of said genes including all biologically-active derivatives thereof.  
The invention further relates to the use of said gene products (including said orthologues) in the development or isolation of anti-  
proliferative agents, particularly their use in appropriate screening assays, and their use for diagnosis and treatment of proliferative  
diseases.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/13034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/435 A61K38/17 G01N33/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) <b>EMBL, SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<b>X</b>	DATABASE EMBL 'Online! EMBL-EBI; 23 June 1998 (1998-06-23) THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM: "Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology" Database accession no. AL024499 XP002199986 cited in the application *gene H38K22.2b; protein CAB54261* *gene H38K22.2a; protein CAC42317* -& DATABASE GENBANK 'Online!'	1-6
<b>X</b>	NCBI; 25 October 2000 (2000-10-25) THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM: "Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology" Database accession no. AL024499 XP002199987  --/--	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  <b>17 September 2002</b>	Date of mailing of the international search report  <b>16.10.02</b>	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer  <b>Steffen, P</b>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 01/13034
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>*gene H38K22.2b; protein CAB54261*</p> <p>*gene H38K22.2a; protein CAC42317*</p> <p>-----</p> <p>THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM: "Genome sequence of the nematode C. elegans: A platform for investigating biology." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 282, no. 5396, 11 December 1998 (1998-12-11), pages 2012-2018, XP002199976 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>KAITNA SUSANNE ET AL: "Incenp and an Aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis." CURRENT BIOLOGY, vol. 10, no. 19, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 1172-1181, XP002199977 ISSN: 0960-9822 the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>BOXEM MIKE ET AL: "The Caenorhabditis elegans gene ncc-1 encodes a cdc2-related kinase required for M phase in meiotic and mitotic cell divisions, but not for S phase." DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 126, no. 10, May 1999 (1999-05), pages 2227-2239, XP002199978 ISSN: 0950-1991 the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>HONG YANG ET AL: "Developmental regulation of a cyclin-dependent kinase inhibitor controls postembryonic cell cycle progression in Caenorhabditis elegans." DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 125, no. 18, 1998, pages 3585-3597, XP002199979 ISSN: 0950-1991 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 01/13034
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOENCZY ET AL.: "Large-scale Screening for Genes Required for Cell Division in <i>C. elegans</i> ." PRESS BOOK 39. ASCB ANNUAL MEETING SELECTED BIOMEDICAL ABSTRACTS, DECEMBER 11-15, 1999, WASHINGTON, D.C., 'Online! 11 - 15 December 1999, XP002199980 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.ascb.org/meetings/am99/pre ssbk99.pdf> 'retrieved on 2002-05-23! page 10 -page 11 ---	
A	GOENCZY PIERRE ET AL: "Dissection of cell division processes in the one cell stage <i>Caenorhabditis elegans</i> embryo by mutational analysis." JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 144, no. 5, 8 March 1999 (1999-03-08), pages 927-946, XP002199981 ISSN: 0021-9525 cited in the application the whole document ---	
A	FIRE ANDREW ET AL: "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in <i>Caenorhabditis elegans</i> ." NATURE (LONDON), vol. 391, no. 6669, 19 February 1998 (1998-02-19), pages 806-811, XP002199982 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---	
P,A	FRASER ANDREW G ET AL: "Functional genomic analysis of <i>C. elegans</i> chromosome I by systematic RNA interference." NATURE (LONDON), vol. 408, no. 6810, 16 November 2000 (2000-11-16), pages 325-330, XP002199983 ISSN: 0028-0836 the whole document ---	
P,A	GOENCZY PIERRE ET AL: "Functional genomic analysis of cell division in <i>C. elegans</i> using RNAi of genes on chromosome III." NATURE (LONDON), vol. 408, no. 6810, 16 November 2000 (2000-11-16), pages 331-336, XP002199984 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document --- -/-	

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1999)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/13034
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; 9 May 1993 (1993-05-09) WATERSON, R.: "Caenorhabditis elegans cosmid C02F5, complete sequence" Database accession no. L14745 XP002212273 cited in the application *gene="C02F5.1"; CDS 20771.'...!.24078* - & WILSON ET AL.: "2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of C. elegans" NATURE, vol. 368, 3 March 1994 (1994-03-03), pages 32-38, XP002014926 table 1	1-6
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; 16 February 1993 (1993-02-16) WATERSON, R.: "Caenorhabditis elegans cosmid F10E9, complete sequence" Database accession no. L10986 XP002212274 cited in the application *gene="sas-4"; sequence F10E9.8; CDS 25145.'...!.21520* & WILSON ET AL.: "2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of C. elegans" NATURE, vol. 368, 3 March 1994 (1994-03-03), pages 32-38, XP002014926 table 1	1-6
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; 16 August 1997 (1997-08-16) KOHARA, Y.: "C. elegans cDNA clone yk352b6 : 5' end, single read." Database accession no. C64048 XP002212275 the whole document	1-3
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; 16 August 1997 (1997-08-16) MCCOMBIE W.R. ET AL.: "wEST00235 Mixed stage, Stratagene (cat. #937006) Caenorhabditis elegans cDNA clone CEMS47, mRNA sequence." Database accession no. M79698 XP002212276 the whole document	1-3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/13034
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! EMBL-EBI; 17 August 2000 (2000-08-17) MAS ET AL.: "Cloning and expresion analysis of a novel gene, RP42, mapping to an autism susceptibility locus on 6q16" Database accession no. AF292100 XP002199988 cited in the application the whole document	1-6
X	-& "Cloning and expresion analysis of a novel gene, RP42, mapping to an autism susceptibility locus on 6q16" GENOMICS, vol. 65, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 70-74, XP002199985 page 70; figure 1	1-6
T	KHELFAOUI MALIK ET AL: "Early neuronal and glial determination from mouse E10.5 telencephalon embryonic stem cells: An in vitro study." NEUROREPORT, vol. 13, no. 9, 2002, pages 1209-1214, XP001095765 2 July, 2002 ISSN: 0969-4965 page 1211, right-hand column, paragraph 2	1-6, 11, 12, 19

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/EP 01/13034
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 12, 13, 21 and 22 are directed to a method of treatment or diagnosis of or practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">see additional sheet</p> <p>As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT, part of the additional fees are to be refunded.</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

International Application No. PCT/EP 01 A3034

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. Claims: 1-22 (all partly)

An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation, comprising a nucleic acid molecule being presented in SEQ ID NO's 1-3, or nucleic acid sequences encoding a polypeptide exhibiting a sequence identity with SEQ ID NO's 8 and 9 of at least 25% over 100 residues.

Furthermore are included various embodiments relating to the said nucleic acid molecules, the corresponding polypeptides, antibodies to the said polypeptides, various uses of the said nucleic acids and polypeptides in screening assays and various diagnosis and treatment related embodiments of the said nucleic acids and polypeptides.

## 2. Claims: 1-22 (all partly)

An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation, comprising a nucleic acid molecule being presented in SEQ ID NO's 4, 5, or nucleic acid sequences encoding a polypeptide exhibiting a sequence identity with SEQ ID NO 10 of at least 25% over 100 residues.

Furthermore are included various embodiments relating to the said nucleic acid molecules, the corresponding polypeptides, antibodies to the said polypeptides, various uses of the said nucleic acids and polypeptides in screening assays and various diagnosis and treatment related embodiments of the said nucleic acids and polypeptides.

## 3. Claims: 1-22 (all partly)

An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation, comprising a nucleic acid molecule being presented in SEQ ID NO's 6, 7, or nucleic acid sequences encoding a polypeptide exhibiting a sequence identity with SEQ ID NO 11 of at least 25% over 100 residues.

Furthermore are included various embodiments relating to the said nucleic acid molecules, the corresponding polypeptides, antibodies to the said polypeptides, various uses of the said nucleic acids and polypeptides in screening assays and various diagnosis and treatment related embodiments of the said nucleic acids and polypeptides.

## 4. Claims: 1-22 (all partly)

International Application No. PCT/EP 01 /3034

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide functionally involved in cell division and proliferation, comprising a nucleic acid molecule being presented in SEQ ID NO's 12, or nucleic acid sequences encoding a polypeptide exhibiting a sequence identity with SEQ ID NO 13 of at least 25% over 100 residues.

Furthermore are included various embodiments relating to the said nucleic acid molecules, the corresponding polypeptides, antibodies to the said polypeptides, various uses of the said nucleic acids and polypeptides in screening assays and various diagnosis and treatment related embodiments of the said nucleic acids and polypeptides.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	5 B 0 7 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 6 F 17/30	1 7 0 F
G 0 6 F 17/30	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 イチーベリ, クリストフ  
ドイツ連邦共和国 6 9 1 1 7 ハイデルベルグ, スクロッスバーグ 1 0 エー

(72) 発明者 ゴエンズィー, ピエール  
スイス連邦 シー エイチ 1 0 0 7 ローザンヌ, アベニュー デ ラ ハーブ, 1 0

(72) 発明者 ハイマン, アンソニー  
ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデルベルグ, ホルダーリンウエグ 1 4

(72) 発明者 ジョーンズ, スティーブン  
カナダ ブイ 5 ゼット 4 イー 6 ブリティッシュ コロンビア, バンクーバー, ウェスト 1 0 アベニュー 6 0 0

(72) 発明者 オエゲマ, カレン  
ドイツ連邦共和国 6 9 1 1 7 ハイデルベルグ, スクロッスバーグ 1 0 ビー

(72) 発明者 キルカーム, マシュー  
ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデルベルグ, レイデンバーゲストラッセ 5 7

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 BB50 FA16 FB01 FB02 FB03  
4B024 AA20 BA31 BA43 CA03 CA04 DA02 EA04 HA12  
4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QR32 QR55 QS25 QS34  
4B064 AG01 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13 DA14  
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01 CA44 CA46  
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA20 DA75 DA86 EA50 FA74  
5B075 UU18

专利名称(译)	真核细胞分裂基因及其在增殖性疾病诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004526421A</a>	公开(公告)日	2004-09-02
申请号	JP2002542118	申请日	2001-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	硒尼克斯门生物科学的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	Senikkusu生物科学门的Em-基于硬		
[标]发明人	イチーベリクリストフ ゴエンズイーピエール ハイマンアンソニー ジョーンズスティーブン オエゲマカレン キルカームマシュー		
发明人	イチーベリ,クリストフ ゴエンズイー,ピエール ハイマン,アンソニー ジョーンズ,スティーブン オエゲマ,カレン キルカーム,マシュー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 C07K14/435 C07K14/44 C07K16/20 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G06F17/30		
CPC分类号	C07K14/43545 A61K38/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/44 C07K16/20 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G06F17/30.170.F C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/BB50 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA20 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA20 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74 5B075/UU18		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
优先权	60/246750 2000-11-09 US		
其他公开文献	JP2004526421A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明在细胞分裂和增殖过程中对某些秀丽隐杆线虫基因及其相应的基因产物，以及对于所有这些生物，都具有突出的功能作用。它涉及所述基因的功能直向同源物的鉴定和分离，所述直向同源物诸如生物活性衍生物。本发明进一步涉及所述基因和基因产物（例如所述直向同源物）在开发或分离抗增殖剂中的用途，特别是在合适的筛选测定中以及在诊断和治疗增殖性疾病中的用途。要做。

