

(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2005-504830

(P2005-504830A)

(43) 公表日 平成17年2月17日(2005.2.17)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	E 4 B O 5 0
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395	T 4 B O 6 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 178 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-532652 (P2003-532652)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成14年10月4日 (2002.10.4)		ミレニアム・ファーマシューティカルズ・
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月1日 (2004.4.1)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/031948		MILLENNIUM PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02003/029434		UTICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003.4.10)		アメリカ合衆国02139マサチューセツ
(31) 優先権主張番号	09/971,791		州ケンブリッジ、ランズタウン・ストリ
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001.10.4)		ート40番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HK I D - 1 関連タンパク質ファミリーの新規な分子およびその使用

## (57) 【要約】

新規のHK I D - 1 ポリペプチド、HK I D - 1 タンパク質、およびHK I D - 1 核酸分子が開示される。単離された全長HK I D - 1 タンパク質へのさらなる付加により、本発明は、単離されたHK I D - 1 融合タンパク質、HK I D - 1 抗原性ペプチド、および抗HK I D - 1 抗体をさらに提供する。本発明はまた、HK I D - 1 核酸分子、本発明の核酸分子を含むHK I D - 1 組み換え発現ベクター、発現ベクターが導入されている宿主細胞、およびHK I D - 1 遺伝子が導入されているか、または破壊されている非ヒトトランスジェニック動物を提供する。本発明の組成物を使用する診断方法、スクリーニング方法、および治療方法もまた提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞におけるポリペプチドのレベルまたは活性を調節するための方法であって、該方法は、薬剤が、該ポリペプチドのレベルまたは活性を調節することを可能にする条件下で、該ポリペプチドを発現する細胞を、該薬剤と接触させる工程を包含し、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む、方法。

## 【請求項 2】

前記薬剤が、抗体である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記細胞がインビトロにある、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記細胞がインビボにある、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記細胞が、該細胞に関連する増殖性障害を有する被験体由来である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記調節が、癌に関連する障害を有するか、または該障害を有する素因を有する被験体における調節である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

細胞におけるポリペプチドのレベルまたは活性を調節するための方法であって、該方法は、薬剤が、該ポリペプチドのレベルまたは活性を調節することを可能にする条件下で、該ポリペプチドを発現する細胞を、該薬剤と接触させる工程を包含し、ここで、該ポリペプチドは、以下：

20

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の配列改変体のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、ここで該配列改変体は、キナーゼ活性を有し、そして配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 90% の配列同一性を有するヌクレオチド配列によりコードされる、ポリペプチド；

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の配列改変体のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、ここで該配列改変体は、キナーゼ活性を有し、そして配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 95% の配列同一性を有するヌクレオチド配列によりコードされる、ポリペプチド；および

30

(c) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の配列改変体のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、ここで該配列改変体は、キナーゼ活性を有し、そして配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 98% の配列同一性を有するヌクレオチド配列によりコードされる、ポリペプチド、

からなる群より選択される、方法。

## 【請求項 8】

前記薬剤が、抗体である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記細胞がインビトロにある、請求項 7 に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

前記細胞がインビボにある、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記細胞が、該細胞に関連する増殖性障害を有する被験体由来である、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記調節が、癌に関連する障害を有するか、または該障害を有する素因を有する被験体における調節である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 13】

細胞における核酸分子のレベルを調節するための方法であって、該方法は、薬剤が、該核

50

酸分子のレベルを調節することを可能にする条件下で、該核酸分子を含む細胞を、該薬剤と接触させる工程を包含し、ここで、該核酸分子は、以下：

- ( a ) 配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列；
  - ( b ) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する、方法。

【請求項 1 4】

前記細胞がインビトロである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記細胞がインビボである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記細胞が、該細胞に関連する増殖性障害を有する被験体由来である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記調節が、癌に関連する障害を有するか、または該障害を有する素因を有する被験体における、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

細胞における核酸分子のレベルを調節するための方法であって、該方法は、薬剤が、該核酸分子のレベルを調節することを可能にする条件下で、該核酸分子を含む細胞を、該薬剤と接触させる工程を包含し、ここで、該核酸分子は、以下：

- ( a ) キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 0 % の配列同一性を有する、ヌクレオチド配列；
  - ( b ) キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する、ヌクレオチド配列；および
  - ( c ) キナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 9 8 % の配列同一性を有する、ヌクレオチド配列、
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有する、方法。

【請求項 1 9】

前記細胞がインビトロである、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記細胞がインビボである、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記細胞が、該細胞に関連する増殖性障害を有する被験体由来である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記調節が、癌に関連する障害を有するか、または該障害を有する素因を有する被験体における調節である、請求項 1 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

( 発明の背景 )

プロテインキナーゼは、細胞増殖および分裂に関連する、生化学的変化および形態変化の調節において重要な役割を果たす ( D ' U r s o , G . ら ( 1 9 9 0 ) S c i e n c e 2 5 0 : 7 8 6 - 7 9 1 ; B i r c h m e i e r , C . ら ( 1 9 9 3 ) B i o e s s a y s 1 5 : 1 8 5 - 1 8 9 ) 。 それらは、増殖因子レセプターおよびシグナル伝達物質として働き、細胞のトランスフォーメーションおよび悪性度に関連している ( H u n t e r , T . ら ( 1 9 9 2 ) C e l l 7 0 : 3 7 5 - 3 8 7 ; P o s a d a , J . ら ( 1 9 9 2 ) M o l . B i o l . C e l l 3 : 5 8 3 - 5 9 2 ; H u n t e r , T . ら ( 1 9 9

10

20

30

40

50

4) Cell 79: 573 - 582)。例えば、プロテインキナーゼは、増殖因子レセプターからのシグナル伝達 (Sturgill, T. W. ら (1988) Nature 344: 715 - 718; Gomez, N. ら (1991) Nature 353: 170 - 173)、細胞が有糸分裂状態に入ることの制御 (Nurse, P. (1990) Nature 344: 503 - 508; Maller, J. L. (1991) Curr. Opin. Cell Biol. 3: 269 - 275) およびアクチンの束形成 (bundling) の調節 (Husain-Chishti, A. ら (1988) Nature 334: 718 - 721) に関与することが示されている。プロテインキナーゼは、アミノ酸配列の類似性、またはセリン/スレオニンもしくはチロシン残基のいずれかに対する特異性のいずれかに基づいて、2つの大きな群に分けられ得る。少数の二重特異性キナーゼは、セリン/スレオニン特異的群に構造的に類似している。広い分類内では、キナーゼは、そのメンバーが、高い程度の触媒性ドメインアミノ酸配列同一性を共有し、類似の生化学的特性もまた有するファミリーにさらに下位分類され得る。大部分のプロテインキナーゼファミリーのメンバーはまた、それらの特定の細胞役割を反映するキナーゼドメイン以外に構造的特徴を共有する。これらとしては、キナーゼ活性または他のタンパク質との相互作用を制御する調節ドメインが挙げられる (Hanks, S. K. ら (1988) Science 241: 42 - 52)。

10

#### 【0002】

ラットKID-1は、膜脱分極またはフォルスコリンによって誘導されるが、ニューロトロフィンによっても増殖因子によっても誘導されないセリン/スレオニンプロテインキナーゼである (Feldman, J. D. ら (1998) J. Biol. Chem. 273: 16535 - 16543)。ラットKID-1は、最初期遺伝子であり、カイニン酸および電気痙攣ショックに応答して海馬および皮質の特定の領域において誘導される。このことは、ラットKID-1が、神経機能、シナプス形成性、学習、および記憶、ならびにカイニン酸による痙攣およびいくつかの神経系関連疾患 (例えば、痙攣および癲癇) に関与することを示唆する。ラットKID-1パラログとしては、前癌遺伝子であることが公知のPIM-1タンパク質が挙げられる。Pim-1は、サイトカイン媒介性有糸分裂シグナルの伝達に関与する。さらに、Pim-1とcMy cとの間には強い相乗的腫瘍形成、ならびにアポトーシス誘導に対する関連がある (Mochizuki, T. ら (1999) J. Biol. Chem. 274: 18659 - 18666)。細胞サイクルホスファターゼCdc25A (cMy cの直接的な転写標的) はまた、Pim-1キナーゼの基質であることが見いだされた。本発明は、少なくとも一部分は、ラットKID-1のヒト種のオルソログ (HKID-1とよばれる) の発見に基づく。

20

30

#### 【発明の開示】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0003】

##### (発明の要旨)

本発明は、少なくとも一部分は、HKID-1 (セリン/スレオニンプロテインキナーゼスーパーファミリーのメンバーであると推定される細胞内タンパク質) をコードする遺伝子の発見に基づく。このことに基づいて、本発明は、単離されたHKID-1タンパク質およびHKID-1タンパク質をコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、HKID-1タンパク質またはHKID-1核酸を検出する方法、およびHKID-1タンパク質またはHKID-1核酸の調節因子を同定するための方法を提供する。

40

#### 【0004】

##### (発明の詳細な説明)

本発明は、ヒトHKID-1 (セリン/スレオニンキナーゼスーパーファミリーのメンバー) をコードするcDNA分子の発見に基づく。ヒトHKID-1タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、図1に示される (配列番号1; 配列番号3は、オープンリーディングフレームのみを含む)。HKID-1タンパク質の推定アミノ酸配列もまた、図1に示される (配列番号2)。

50

## 【0005】

配列番号2のHKID-1タンパク質は、以下の部位またはドメインを有すると推定される：配列番号2のアミノ酸260～263由来の1つのcAMP依存性およびcGMP依存性キナーゼリン酸化部位(PS00004；配列番号4)；配列番号5；配列番号2のアミノ酸137～139、275～277、および279～281に由来する3つのプロテインキナーゼCリン酸化部位(PS00005；配列番号6)；配列番号7～9；配列番号2のアミノ酸202～205、211～214、および321～324に由来する3つのカゼインキナーゼIIリン酸化部位(PS00006；配列番号10)；配列番号11～13；配列番号2のアミノ酸33～40に由来する1つのチロシンキナーゼリン酸化部位(PS00007；配列番号14)；配列番号15；配列番号2のアミノ酸43～48、49～54、57～62、63～68、80～85、98～103、および295～300に由来する7つのN-ミリスチル化部位(PS00008；配列番号16)；配列番号17～23；配列番号2のアミノ酸46-54に由来する1つのプロテインキナーゼATP結合領域シグナチャ(PS00107；配列番号24)；配列番号25；配列番号2のアミノ酸166～178に由来する1つのセリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグナチャ(PS00108；配列番号26；配列番号27；ならびに配列番号2のアミノ酸40～293の隠されたMarkovモデル(HMM)に由来する1つの真核生物プロテインキナーゼドメインコンセンサス(PF00069；配列番号28)；配列番号29。PFAM識別子に関する一般的情報については、PSプレフィクスおよびPFプレフィクスドメイン識別番号とは、Sonnhammerら(1997)Protein 28:405-420およびwww.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.htmlをいう。

## 【0006】

配列番号2のHKID-1ポリペプチド配列を、MEMSAT膜貫通ドメイン推定ソフトウェアを用いて分析した。MEMSATにより、配列番号2のHKID-1ポリペプチド配列の3つの潜在的膜貫通ドメイン：アミノ酸42～58(配列番号42)、アミノ酸78～94(配列番号43)、およびアミノ酸226～245(配列番号44)が推定された。HKID-1のラットオルソログであるラットKID-1は、可溶性タンパク質であることが公知であるので、MEMSATによって推定されるこの潜在的膜貫通ドメインは、HKID-1タンパク質のコアでの疎水性相互作用に關与するHKID-1タンパク質の疎水性ドメインを示すのであって、膜貫通ドメインではない可能性が高い。

## 【0007】

本発明の実施形態において、HKID-1分子は、非限定的例としての神経系の細胞、海馬および皮質の細胞において発現されそして/または機能するプロテインキナーゼである。

## 【0008】

本明細書中で使用される場合、用語「プロテインキナーゼ」は、それ自体のリン酸化状態または別のタンパク質もしくはポリペプチドのリン酸化状態を調節し得る、タンパク質またはポリペプチドを含む。プロテインキナーゼは、セリン/スレオニン残基、チロシン残基、またはセリン/スレオニンおよびチロシン残基の両方(例えば、二重特異性キナーゼ)に対する特異性(すなわち、リン酸化する特異性)を有し得る。チロシンまたはセリン/スレオニンのいずれかのリン酸化に対するプロテインキナーゼの特異性は、サブドメインのうち2つ(VIbおよびVII)の配列によって推定され得る(例えば、Hanksら(1988)Science 241:42-52(その内容は、本明細書中に参考として援用される)に記載される)。

## 【0009】

プロテインキナーゼは、これらを発現する細胞と関連するシグナル伝達系路において役割を果たす。従って、HKID-1分子は、神経細胞において発現されるので、HKID-1は、以下に關与し得る：1)神経系障害；2)痙攣；3)癲癇；4)学習；5)記憶；または6)シナプス形成性。HKID-1はまた、前癌遺伝子であることが公知であるP

IM - 1 タンパク質のパラログであるので、増殖障害（例えば、癌）に關与し得る。

【0010】

細胞増殖障害および/または細胞分化障害の例としては、癌（例えば、癌腫、肉腫、転移性障害もしくは造血新生物障害（例えば、白血病））が挙げられる。転移性腫瘍は、多数の原発性腫瘍型（前立腺、結腸、肺、胸部および肝臓が起源のものが挙げられるが、これらに限定されない）から生じ得る。

【0011】

本明細書中で使用される場合、用語「癌」、「過剰増殖性」および「新生物性」とは、自律的増殖の能力を有する細胞（すなわち、急激に拡大する細胞増殖によって特徴付けられる異常な状況または状態）をいう。過剰増殖状態および新生物性疾患状態は、病理的（すなわち、疾患状態を特徴付けるかまたは構成する）と分類され得るか、または非病理的（すなわち、正常からずれてはいるが、疾患状態とは関連しない）と分類され得る。この用語は、組織病理学的型または侵襲性の段階とは無関係に、全ての型の癌性増殖もしくは腫瘍形成プロセス、転移性組織もしくは悪性に変化した細胞、組織もしくは器官を含むことが意味される。「病理的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍増殖により特徴付けられる疾患状態において発生する。非病理的過剰増殖性細胞の例としては、創傷修復に關連する細胞の増殖が挙げられる。

10

【0012】

用語「癌」または「新生物」は、種々の器官系（例えば、罹患している肺、胸部、甲状腺、リンパ、胃腸管および尿生殖器管）の悪性度、ならびに悪性度を含む腺癌（例えば、大部分の結腸癌、腎細胞癌腫、前立腺癌および/または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌腫、小腸の癌および食道の癌）を含む。

20

【0013】

用語「癌腫」は、当該分野で認識されており、呼吸器系癌腫、胃腸系癌腫、尿生殖器系癌腫、精巣癌腫、胸部癌腫、前立腺癌腫、内分泌系癌腫、および黒色腫を含む、上皮組織または内分泌組織の悪性疾患をいう。例示的な癌腫としては、頸部（c e r v i x）、肺、前立腺、胸部、頭部および頸部（n e c k）、結腸ならびに卵巣の組織から形成する癌腫が挙げられる。この用語はまた、癌肉腫（例えば、これは、癌性かつ肉腫性組織から構成される悪性腫瘍を含む）を含む。「腺癌」とは、腺組織に由来するかまたは腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫をいう。

30

【0014】

用語「肉腫」は、当該分野で認識されており、間葉由来の悪性腫瘍をいう。

【0015】

造血性新生物障害としては、造血性起源の過形成性/新生物性細胞（例えば、骨髄系統、リンパ系統もしくは赤血球系統、またはこれらの前駆細胞から生じる）を含む疾患が挙げられる。好ましくは、これらの疾患は、未分化型急性白血病（例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病から生じる。さらなる例示的な骨髄障害としては、急性前骨髄性白血病（A P M L）、急性骨髄性白血病（A M L）および慢性骨髄性白血病（C M L）（V a i c k u s , L . ( 1 9 9 1 ) C r i t . R e v . i n O n c o l . / H e m o t o l . 1 1 : 2 6 7 - 9 7 において総説される）が挙げられるが、それらに限定されない；リンパ系の悪性疾患としては、急性リンパ芽球性白血病（A L L）（B系統A L LおよびT系統A L Lを含む）、慢性リンパ性白血病（C L L）、前リンパ性白血病（P L L）、ヘアリーセル白血病（H L L）およびヴァルデンストレームマクログロブリン血症（W M）が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる形態の悪性リンパ腫としては、非ホジキンリンパ腫およびその異型、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫（A T L）、皮膚T細胞リンパ腫（c u t a n e o u s T - c e l l l y m p h o m a）（C T C L）、大顆粒リンパ性白血病（l a r g e g r a n u l a r l y m p h o c y t i c l e u k e m i a）（L G F）、ホジキン病、およびリード-スターンバーグ病が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0016】

50

本発明の種々の局面は、以下のサブセクションにおいてさらに詳細に記載される。

【0017】

(I. 単離された核酸分子)

H K I D - 1 c D N A 配列 (配列番号 1) は、非翻訳領域を含めて約 2 1 2 6 ヌクレオチド長であり、約 3 5 . 8 6 k D a (翻訳後修飾を除く) の推定分子量を有する 3 2 6 アミノ酸タンパク質 (配列番号 2) をコードする、9 7 8 塩基対の推定メチオニン開始コード配列 (配列番号 1 のヌクレオチド 1 7 1 ~ 1 2 5 9 ; 配列番号 3) を含む (図 1)。

【0018】

本発明の 1 つの局面は、H K I D - 1 タンパク質またはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子、ならびにハイブリダイゼーションプローブとして使用して H K I D - 1 コード核酸 (例えば、H K I D - 1 m R N A) を同定するに十分な核酸分子、および H K I D - 1 核酸分子の増幅または変異のための P C R プライマーとして用いられるフラグメントを提供する。本明細書中で用いられる場合、用語「核酸分子」は、D N A 分子 (例えば、c D N A またはゲノム D N A) および R N A 分子 (例えば、m R N A) ならびにヌクレオチドアナログを用いて作製された D N A または R N A のアナログを包含することが意図される。この核酸分子は、1 本鎖または 2 本鎖であり得るが、好ましくは 2 本鎖 D N A である。

10

【0019】

「単離された」核酸分子は、その核酸の天然の供給源中に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子である。好ましくは、「単離された」核酸は、その核酸を誘導した生物のゲノム D N A において天然でその核酸に隣接する配列 (すなわち、その核酸の 5 ' 末端および 3 ' 末端に位置する配列) (好ましくは、タンパク質コード配列) を含まない。例えば、種々の実施形態では、この単離された H K I D - 1 核酸分子は、その核酸を誘導した細胞のゲノム D N A 中のその核酸分子に天然で隣接する、約 5 k b 未満、約 4 k b 未満、約 3 k b 未満、約 2 k b 未満、約 1 k b 未満、約 0 . 5 k b 未満または約 0 . 1 k b 未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子 (例えば、c D N A 分子) は、他の細胞性物質を、組換え技術によって産生された場合は培養培地を実質的に含まなくてもよく、あるいは、化学的に合成された場合、化学的前駆体も他の化学物質も実質的に含まなくてもよい。

20

【0020】

本発明の単離された核酸分子 (例えば、配列番号 1 もしくは配列番号 3 のヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの相補体を有する核酸分子) は、標準的な分子生物学的技術および本明細書中に提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして配列番号 1 または配列番号 3 の核酸配列の全てまたは一部分を用いて、H K I D - 1 核酸分子は、標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術を用いて単離され得る (例えば、S a m b r o o k ら編、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 第 2 版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y , 1 9 8 9 に記載される通り)。

30

40

【0021】

本発明の核酸分子は、c D N A、m R N A またはゲノム D N A をテンプレートとして、そして適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、標準的 P C R 増幅技術に従って増幅され得る。このようにして増幅された核酸は、適切なベクター中にクローニングされ得、そして D N A 配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、H K I D - 1 ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的合成技術によって (例えば、自動化 D N A 合成機を用いて) 調製され得る。

【0022】

本発明は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列またはその相補体に対して少なくとも 2 6 % (または 3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 5 %、6 5 %、7 5 %、8 5 %、9

50

0%、95%、もしくは98%)同一である、単離された核酸分子を特徴とする。本発明はまた、配列番号3に示されるヌクレオチド配列またはその相補体に対して少なくとも43%(または45%、50%、55%、65%、75%、85%、90%、95%、もしくは98%)同一である、単離された核酸分子を特徴とする。

**【0023】**

本発明はまた、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95.5%(または95.8%、96%、96.5%、97%、98%もしくは99%)同一であるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を特徴とする。

**【0024】**

1つの実施形態では、単離されたHKID-1核酸分子は、配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列を有する。

**【0025】**

本発明内にあるのはまた、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントをコードする単離された核酸分子であり、このフラグメントは、配列番号2のうちの少なくとも15(または25、30、50、100、150、200、250、270、290、310もしくは326)個連続したアミノ酸を含む。

**【0026】**

さらに、本発明の単離された核酸分子は、HKID-1をコードする単離された核酸配列の一部のみ(例えば、プローブもしくはプライマーとして用いられ得るフラグメント、またはHKID-1の生物学的に活性な部分をコードするフラグメント(例えば、配列番号1のヌクレオチド306~332を含むフラグメント、HKID-1のこのプロテインキナーゼATP結合領域シグネチャードメインをコードするフラグメント、配列番号1のヌクレオチド666~704、HKID-1のセリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャードメインをコードするフラグメント、およびHKID-1の真核生物プロテインキナーゼドメインをコードする配列番号1のヌクレオチド288~1049))を含み得る。

**【0027】**

ヒトHKID-1の遺伝子および/またはcDNAから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型における(例えば、他の組織由来の)HKID-1ホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のHKID-1オルソログおよびHKID-1ホモログを同定ならびに/またはクローニングするために使用するために設計されたプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは代表的に、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを包含する。このオリゴヌクレオチドは代表的に、ストリンジェントな条件下で、配列番号1もしくは配列番号3のセンス配列またはアンチセンス配列、または配列番号1もしくは配列番号3の天然に存在する変異体および/もしくは対立遺伝子改変体のうちの少なくとも約12、好ましくは約25、より好ましくは約50、75、100、125、150、175、200、250、300、350または400個連続したヌクレオチドに対してハイブリダイズするヌクレオチド配列領域を包含する。

**【0028】**

ヒトHKID-1ヌクレオチド配列に基づくプローブを用いて、同じかもしくは同一のタンパク質またはそれらの対立遺伝子改変体をコードする、転写産物、cDNA、またはゲノム配列を検出し得る。このプローブは、それに結合した標識基(例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、酵素補因子)を含む。このようなプローブは、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のHKID-1をコードする核酸のレベルを測定することによって(例えば、HKID-1 mRNAレベルを検出することまたはゲノムHKID-1遺伝子の変異したかもしくは欠失したかを決定することによって)、HKID-1タンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として用いられ得る。

**【0029】**

10

20

30

40

50

本発明の別の実施形態は、セリン/トレオニンプロテインキナーゼスーパーファミリーの他のメンバーをコードする核酸分子と比較して、HKID-1核酸分子を特異的に検出する、単離されたHKID-1核酸分子を特徴とする。例えば、1つの実施形態では、単離されたHKID-1核酸分子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3のヌクレオチド配列を含む核酸分子またはそれらの相補体に対してハイブリダイズする。別の実施形態では、単離されたHKID-1核酸分子は、少なくとも547（または550、600、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2126もしくは2200）ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子またはそれらの相補体に対してハイブリダイズする。別の実施形態では、単離されたHKID-1核酸分子は、HKID-1のプロテインキナーゼATP結合領域シグネチャードメインをコードする、配列番号1のヌクレオチド306～332、またはその相補体を含む。なお別の実施形態では、単離されたHKID-1核酸分子は、HKID-1のセリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャードメインをコードする、配列番号1のヌクレオチド666～704、またはその相補体を含む。別の実施形態では、単離されたHKID-1核酸分子は、HKID-1の真核生物プロテインキナーゼドメインをコードする、配列番号1のヌクレオチド288～1049、またはその相補体を含む。別の実施形態では、本発明は、HKID-1核酸のコード鎖に対してアンチセンスである、単離された核酸分子を提供する。

10

20

#### 【0030】

「HKID-1の生物学的に活性な部分」をコードする単離された核酸フラグメントは、配列番号1または配列番号3の一部を単離し、HKID-1タンパク質のコードされる部分を（例えば、インビトロでの組換え発現によって）発現し、そしてHKID-1のコードされる部分の活性を評価することによって調製され得る。例えば、HKID-1の生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸フラグメントとしては、以下のうちの1以上が挙げられる：配列番号2の（例えば、アミノ酸260～263由来の）cAMPおよびcGMP依存性のプロテインキナーゼリン酸化部位（PS00004；配列番号4）；配列番号5；配列番号2の（例えば、アミノ酸137～139、275～277、および279～281由来の）プロテインキナーゼCリン酸化部位（PS00005；配列番号6）；配列番号7～9；配列番号2の（例えば、アミノ酸202～205、211～214、および321～324由来の）カゼインキナーゼIIリン酸化部位（PS00006；配列番号10）；配列番号11～13；配列番号2の（例えば、アミノ酸33～40由来の）チロシンキナーゼリン酸化部位（PS00007；配列番号14）；配列番号15；配列番号2のアミノ酸43～48、49～54、57～62、63～68、80～85、98～103、および295～300由来のN-ミリスチル化部位（PS00008；配列番号16）；配列番号17～23；配列番号2の（例えば、アミノ酸46～54由来の）プロテインキナーゼATP結合領域シグネチャー（PS00107；配列番号24）；配列番号25；配列番号2の（例えば、アミノ酸166～178由来の）セリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー（PS00108；配列番号26）；配列番号27；ならびに配列番号2の（例えば、アミノ酸40～293由来の）真核生物プロテインキナーゼドメイン（PF00069；配列番号28）；配列番号29。

30

40

#### 【0031】

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列と異なり、従って、配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質と同じHKID-1タンパク質をコードする、単離された核酸分子を包含する。

#### 【0032】

配列番号1または配列番号3に示されるヒトHKID-1ヌクレオチド配列に加えて、HKID-1のアミノ酸配列における変化をもたらすDNA配列多型が、集団（例えば、ヒ

50

トの集団)内に存在し得ることを当業者は理解する。HKID-1遺伝子におけるこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子バリエーションに起因して集団内の個体間に存在し得る。対立遺伝子は、所定の遺伝子座に代替的に存在する遺伝子の群の1つである。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」とは、HKID-1タンパク質、好ましくは、哺乳動物HKID-1タンパク質をコードする、オープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。本明細書中で使用される場合、句「対立遺伝子改変体」とは、HKID-1遺伝子座に存在するヌクレオチド配列か、またはこのヌクレオチド配列にコードされるポリペプチドをいう。このような天然の対立遺伝子バリエーションは、代表的に、HKID-1遺伝子のヌクレオチド配列において、1~5%の変異を生じ得る。代替的な対立遺伝子は、多くの異なる個体において目的の遺伝子を配列決定することによって同定され得る。これは、種々の個体における同じ遺伝子座を同定するためのハイブリダイゼーションプローブを使用することによって、容易に行われ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてHKID-1の機能活性を変更しない、HKID-1における、このようなヌクレオチドバリエーション、および生じるアミノ酸多型もしくはアミノ酸バリエーションのいずれか、および全ては、本発明の範囲内にあることが意図される。HKID-1の対立遺伝子改変体は、実施例5に示されるHKID-1の遺伝子座および物理的位置に対して、第22染色体連鎖群の先端から196.70 centiRayの、D22S1169とD22S\_\_qterマーカーとの間の第22染色体にあると物理的および遺伝子的にマッピングされる。

10

#### 【0033】

本発明は、天然に存在する対立遺伝子改変体をコードする単離された核酸分子を含み、この核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドの、完全に機能的なタンパク質、部分的に機能的なHKID-1タンパク質または非機能的なタンパク質をコードし、ここで、この核酸分子は、ストリンジェントな条件下配列番号1、配列番号3、またはその補体を含む核酸分子にハイブリダイズする。

20

#### 【0034】

さらに、他の種由来のHKID-1タンパク質をコードする単離された核酸分子(HKID-1ホモログまたはHKID-1オルソログ)(これらは、ヒトHKID-1のヌクレオチド配列と異なるヌクレオチド配列を有する)は、当該分野で公知のもの(例えば、HKID-1のラット種オルソログおよび*Xenopus laevis*(カエル)種オルソログ)を除いて、本発明の範囲内であることが意図される。本発明のHKID-1 cDNAの天然の対立遺伝子改変体、ホモログ、およびオルソログに対応する核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標準的なハイブリダイゼーション技術に従ってハイブリダイゼーションプローブとして、ヒトcDNAまたはその部分を使用して、本明細書中に開示されるヒトHKID-1核酸に対するその同一性に基づいて単離され得る。HKID-1のオルソログは、しばしば、実施例5に示されるヒトHKID-1の遺伝子座とシニエーである遺伝子座および物理的位置に対して、第22染色体連鎖群の先端から196.70 centiRayの、D22S1169とD22S\_\_qterマーカーとの間の第22染色体にあるとマッピングされる。

30

#### 【0035】

本発明の別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、1)配列番号1に示されるヌクレオチド配列のうちの、少なくとも547ヌクレオチド(または少なくとも、550、600、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100または2126ヌクレオチド)であるか; 2)配列番号3に示されるヌクレオチド配列の少なくとも415ヌクレオチド(または450、500、550、600、650、700、800、900または978ヌクレオチド)であるか; または3)配列番号1; 配列番号30のヌクレオチド1~923由来の少なくとも8ヌクレオチド(または10、15、20、25、35、45、65、85、105、125、175、225、275、325、375、400、450、500、550、600、650、700、750

40

50

、800、850、900または923ヌクレオチド)であるか;あるいは4)配列番号3;配列番号31のヌクレオチド1~344由来の少なくとも8ヌクレオチド(または10、15、20、25、35、45、65、85、105、125、175、225、275、325または344ヌクレオチド)であり、そしてストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3のヌクレオチド配列(好ましくは、コード配列)またはその相補体を含む核酸分子にハイブリダイズする。

【0036】

別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号3に示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子、またはその一部を含む。所定のヌクレオチド配列に相補的な核酸分子は、ストリンジェントな条件下でその所定のヌクレオチド配列にハイブリダイズし得る程度に十分に、その所定のヌクレオチド配列に相補的な核酸分子である。

10

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を記載している。ストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、そしてCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)、6.3.1-6.3.6に見出され得る。水性および非水性の方法が、その参考文献に記載されており、いずれの方法も使用され得る。好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45でのハイブリダイゼーション、その後の、0.2×SSC、0.1% SDS中、50での1回以上の洗浄である。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの別の例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45でのハイブリダイゼーション、その後の、0.2×SSC、0.1% SDS中、55での1回以上の洗浄である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のさらなる例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45でのハイブリダイゼーション、その後の、0.2×SSC、0.1% SDS中、60での1回以上の洗浄である。好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45でのハイブリダイゼーション、その後の、0.2×SSC、0.1% SDS中、65での1回以上の洗浄である。特に好ましいストリンジェンシー条件(および分子が本発明のハイブリダイゼーション限定の中に入るか否かを決定するためにどの条件を適用すべきかについて、実施者が未確定の場合に使用されるべき条件)は、0.5M リン酸ナトリウム、7% SDS、65、その後の0.2×SSC、1% SDS、65での1回以上の洗浄である。好ましくは、ストリンジェントな条件下で配列番号1または配列番号3の配列にハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。

20

30

【0038】

本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子は、自然界で生じるヌクレオチド配列を有する(例えば、天然のタンパク質をコードする)RNA分子またはDNA分子をいう。

40

【0039】

集団に存在し得るHKID-1配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加え、当業者はさらに、HKID-1タンパク質の生物学的活性を変更することなく、配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列中へ変異によって変化が導入され得、これによってコードされるHKID-1タンパク質のアミノ酸配列に変化を導き得ることを理解する。例えば、当業者は、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導く、ヌクレオチド置換を作製し得る。「非必須」アミノ酸残基は、HKID-1の野生型配列(例えば、配列番号2の配列)から、その生物学的活性を変更することなく変更され得る残基であるが、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、種々の種のHKID-1間で保存されていないか、または単に準保存的(semi-conserved)にすぎないア

50

ミノ酸残基は、活性に非必須であり得、従って、変更の標的となり得る。あるいは、種々の種のHKID-1タンパク質間で保存されているアミノ酸残基は、活性に必須であり得、従って、変更の標的ではない。

**【0040】**

例えば、本発明のHKID-1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸46~54；配列番号25由来の少なくとも1つの保存されたプロテインキナーゼATP結合領域表示(PS00107；配列番号24)；配列番号2のアミノ酸166~178；配列番号27由来の少なくとも1つの保存されたセリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性部位表示(PS00108；配列番号26)；および配列番号2のアミノ酸40~293；配列番号29由来の少なくとも1つの保存された真核生物プロテインキナーゼドメイン(PS00069；配列番号28)を含む。例えば、本発明のHKID-1タンパク質は、例えば、配列番号2のアミノ酸260~263；配列番号5由来の少なくとも1つの保存されたまたは保存されていないcAMP依存性およびcGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位(PS00004；配列番号4)；例えば、配列番号2のアミノ酸137~139、275~277、および279~281；配列番号7~9由来のプロテインキナーゼCリン酸化部位(PS00005；配列番号6)；例えば、配列番号2のアミノ酸202~205、211~214、および321~324；配列番号11~13由来のカゼインキナーゼIIリン酸化部位(PS00006；配列番号10)；例えば、配列番号2のアミノ酸33~40；配列番号15由来のチロシンキナーゼリン酸化部位(PS00007；配列番号14)；例えば、配列番号2のアミノ酸43~48、49~54、57~62、63~68、80~85、98~103、および295~300；配列番号17~23由来のN-ミリスチル化部位(PS00008；配列番号16)を含み得る。

10

20

**【0041】**

従って、本発明の別の局面は、活性に必須でないアミノ酸残基の変更を含むHKID-1タンパク質をコードする核酸分子を提供する。このようなHKID-1タンパク質は、配列番号2とアミノ酸配列が異なるが、生物学的活性を依然として保持している。1つの実施形態において、単離された核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも約45%、55%、65%、75%、85%、90%、95%、96%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

**【0042】**

配列番号2の配列と異なる配列を有するHKID-1タンパク質をコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされるタンパク質に導入されるように、配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列に1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を導入することによって作製され得る。変異は、標準的な技術(例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発)によって導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基でなされ得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、分枝側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。従って、HKID-1における推定非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖のファミリーからの別のアミノ酸残基と置換される。あるいは、変異は、HKID-1コード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入され得(例えば、飽和変異誘発(saturation mutagenesis))、そして生じた変異体は、活性を維持する変異体を同定するためにHKID-1の生物学的活性

30

40

50

についてスクリーニングされ得る。変異誘発後、コードタンパク質は、組換え発現され得、そしてこのタンパク質の活性が、測定され得る。

【0043】

1つの実施形態において、変異HKID-1は、(1)プロテインキナーゼによりリン酸化される能力、(2)N-ミリスチル化される能力、(3)ATPに結合する能力、(4)タンパク質をリン酸化する能力、および(5)セリン残基およびスレオニン残基上で特異的にタンパク質をリン酸化する能力についてアッセイされ得る。別の実施形態において、変異HKID-1は、HKID-1を発現する細胞(例えば、神経系の細胞)に関連するシグナル伝達経路において役割を果たすその能力、HKID-1を発現する細胞において発現されるその基質タンパク質とタンパク質-タンパク質相互作用を形成する能力、およびHKID-1を発現する細胞に存在するシグナル伝達経路および生物学的経路におけるタンパク質とタンパク質-タンパク質相互作用を形成する能力についてアッセイされ得る。

10

【0044】

本発明はさらに、アンチセンス核酸分子(すなわち、タンパク質をコードするセンス核酸に相補的(例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的)またはmRNA配列に相補的である分子)を包含する。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。アンチセンス核酸は、HKID-1コード鎖全体に相補的であり得るか、その一部(例えば、タンパク質コード領域(すなわちオープンリーディングフレーム)の全体またはその一部)にのみ相補的であり得る。アンチセンス核酸分子は、HKID-1をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域に対してアンチセンスであり得る。非コード領域(「5'および3'の非翻訳領域」)は、コード領域に隣接し、かつアミノ酸に翻訳されない5'および3'の配列である。

20

【0045】

本明細書中に開示されるHKID-1をコードするコード鎖配列(例えば、配列番号1または配列番号3)を考慮すると、本発明のアンチセンス核酸を、ワトソン-クリック塩基対合則に従って設計し得る。アンチセンス核酸分子は、HKID-1mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、HKID-1mRNAのコード領域または非コード領域の一部に対してのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、HKID-1mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る(例えば、以下の配列: AGAGCAGCATCGCGGGC GACGGC(配列番号35)またはAGCAGCATCGCGGGCGAC(配列番号36)を有するオリゴヌクレオチド)。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5ヌクレオチド長、10ヌクレオチド長、15ヌクレオチド長、20ヌクレオチド長、25ヌクレオチド長、30ヌクレオチド長、35ヌクレオチド長、40ヌクレオチド長、45ヌクレオチド長または50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用する、化学合成および酵素連結反応を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然に存在するヌクレオチド、あるいは分子の生物学的安定性を増加するように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増加させるように(例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用され得る)設計された種々の改変ヌクレオチドを使用して、化学的に合成され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられる: 5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオシン(galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン

30

40

50

、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 $\beta$ -D-マンノシルキューオシン (mannosylqueosine)、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキソシン (wybutoxosine)、シュードウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)<sub>w</sub>、および2,6-ジアミノプリン。あるいは、アンチセンス核酸は、発現ベクターを使用して生物学的に生成され得、この発現ベクター内に、核酸がアンチセンス方向でサブクロニングされている(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向のRNAであり、これは、以下の小節でさらに記載される)。

10

## 【0046】

代表的に、本発明のアンチセンス核酸分子は、被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果これらは、HKID-1タンパク質をコードする細胞性のmRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはこれらに結合し、それによって、タンパク質の発現を阻害する(例えば、転写および/または翻訳を阻害することによって)。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性により得るか、または例えば、DNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合においては、その二重らせんの大きい方の溝における特異的相互作用を介し得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的するように改変され得、次いで全身的に投与され得る。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが、選択された細胞表面上で発現されるレセプターまたは抗原に特異的に結合するように、例えば、細胞表面のレセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に、このアンチセンス核酸分子を結合することによって、改変され得る。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを使用して細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、強力なpol I I Iまたはpol I I I Iプロモーターの制御下に、このアンチセンス核酸分子を配置したベクター構築物が、好ましい。

20

30

## 【0047】

本発明のアンチセンス核酸分子は、 $\beta$ -アノマー核酸分子であり得る。 $\beta$ -アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的二本鎖ハイブリッドを形成し、ここで、通常のコニットとは対照的に、この鎖は、互いに平行に走る(Gaultierら(1987)Nucleic Acids Res. 15:6625-6641)。このアンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoueら(1987)Nucleic Acids Res. 15:6131-6148)またはキメラRNA-DNAアナログ(Inoueら(1987)FEBS Lett. 215:327-330)を含み得る。

## 【0048】

本発明はまた、リボザイムを包含する。リボザイムは、一本鎖核酸(例えば、mRNA)(これに対して、リボザイムは相補的領域を有する)を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従って、リボザイム(例えば、ハンマーヘッド(hammerhead)リボザイム(HaselhoffおよびGerlach(1988)Nature 334:585-591に記載される))を使用して、HKID-1 mRNAの翻訳を阻害し得る。HKID-1をコードする核酸に対する特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示されるHKID-1 cDNAのヌクレオチド配列(例えば、配列番号1、配列番号3)に基づいて設計され得る。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列がHKID-1をコードするmRNAの切

40

50

断されるべきヌクレオチド配列に相補的であるように構築され得る。例えば、C e c hら、米国特許第4,987,071号；およびC e c hら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、H K I D - 1 m R N Aを使用して、R N A分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性R N Aを選択し得る。例えば、B a r t e lおよびS z o s t a k ( 1 9 9 3 ) S c i e n c e 2 6 1 : 1 4 1 1 ~ 1 4 1 8を参照のこと。

#### 【0049】

本発明はまた、三重らせん構造を形成する核酸分子を包含する。例えば、H K I D - 1 遺伝子発現は、H K I D - 1の調節領域（例えば、H K I D - 1プロモーターおよび/またはH K I D - 1エンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中のH K I D - 1 遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般に、H e l e n e ( 1 9 9 1 ) A n t i c a n c e r D r u g D e s . 6 ( 6 ) : 5 6 9 ; H e l e n e ( 1 9 9 2 ) A n n . N . Y . A c a d . S c i . 6 6 0 : 2 7 ; およびM a h e r ( 1 9 9 2 ) B i o a s s a y s 1 4 ( 1 2 ) : 8 0 7を参照のこと。

10

#### 【0050】

いくつかの実施形態において、本発明の核酸分子は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において改変されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは溶解度を改良し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するように改変され得る（H y r u p ら ( 1 9 9 6 ) B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y 4 : 5を参照のこと）。本明細書で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「P N A」は、デオキシリボースリン酸骨格が、偽ペプチド（p s e u d o p e p t i d e）骨格に置換され、そして4つの天然核酸塩基のみが保持されている、核酸模倣物（例えば、DNA模倣物）をいう。P N Aの中性骨格は、低イオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。P N Aオリゴマーの合成は、H y r u p ら ( 1 9 9 6 )、前出；P e r r y - O ' K e e f e ら ( 1 9 9 6 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 1 4 6 7 0に記載されるような標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施され得る。

20

#### 【0051】

H K I D - 1のP N Aは、治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、P N Aは、例えば、転写阻止もしくは翻訳阻止を誘導することまたは複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子（a n t i g e n e）薬剤として使用され得る。H K I D - 1のP N Aはまた、例えば、P N A指向型P C Rクランプ（c l a m p i n g）によって；他の酵素（例えば、S 1ヌクレアーゼ）と組み合わせて使用される場合に人工制限酵素として（H y r u p ( 1 9 9 6 )、前出）；あるいはDNA配列決定およびハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして（H y r u p ( 1 9 9 6 )、前出；P e r r y - O ' K e e f e ら ( 1 9 9 6 )、前出）、例えば、遺伝子における1つの塩基対変異の分析において使用され得る。

30

40

#### 【0052】

別の実施形態において、H K I D - 1のP N Aは、P N Aに対する脂肪親和性基または他のヘルパー基を付着することによって、P N A - DNAキメラの形成によって、あるいはリボソームまたは当該分野で公知の薬物送達の他の技術の使用によって、例えば、それらの安定性、特異性または細胞性取り込みを増強するために改変され得る。P N A - DNAキメラの合成は、H y r u p ( 1 9 9 6 )、前出、F i n n ら ( 1 9 9 6 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 4 ( 1 7 ) : 3 3 5 7 ~ 6 3、M a g ら ( 1 9 8 9 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 1 7 : 5 9 7 3、およびP e t e r s e r ら ( 1 9 7 5 ) B i o o r g a n i c M e d . C h e m . L e t t . 5 : 1 1 1 9に記載されるように実施され得る。

50

## 【 0 0 5 3 】

( I I . 単離された H K I D - 1 タンパク質 )

本発明の 1 つの局面は、単離された H K I D - 1 タンパク質、およびその生物学的に活性な部分、ならびに抗 H K I D - 1 抗体を惹起するための免疫原としての使用に適切なポリペプチドフラグメントを提供する。 1 つの実施形態において、ネイティブ H K I D - 1 タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用する適切な精製スキームによって細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、H K I D - 1 タンパク質は、組換え D N A 技術によって生成される。組換え発現に代えて、H K I D - 1 タンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して化学的に合成され得る。

## 【 0 0 5 4 】

「単離された」タンパク質もしくはその生物学的に活性な部分または「精製された」タンパク質もしくはその生物学的に活性な部分は、H K I D - 1 タンパク質が誘導される細胞または組織供給源からの細胞性物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含有しないか、あるいは、化学的に合成される場合に化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含有しない。語「細胞性物質を実質的に含有しない」は、H K I D - 1 タンパク質が単離されるかまたは組替的に生成される細胞の細胞性成分からこのタンパク質が分離されている、H K I D - 1 タンパク質の調製物を含む。従って、細胞性物質を実質的に含有しない H K I D - 1 タンパク質は、約 3 0 %、2 0 %、1 0 % または 5 % ( 乾燥重量で ) 未満の非 H K I D - 1 タンパク質 ( 本明細書において「夾雑タンパク質」ともいわれる ) を有する H K I D - 1 タンパク質の調製物を含む。H K I D - 1 タンパク質またはその生物学的に活性な部分が組替的に生成される場合、これはまた、好ましくは実質的に培養培地を含有しない ( すなわち、培養培地が、タンパク質調製物の容量の約 2 0 %、1 0 % または 5 % 未満を示す )。H K I D - 1 タンパク質が化学合成によって生成される場合、これは、好ましくは実質的に化学的前駆体または他の化学物質を含有しない ( すなわち、このタンパク質は、このタンパク質の合成に關与する化学的前駆体、または他の化学物質から分離される )。従って、H K I D - 1 タンパク質のこのような調製物は、約 3 0 %、2 0 %、1 0 % または 5 % ( 乾燥重量で ) 未満の化学的前駆体または非 H K I D - 1 化学物質を有する。

## 【 0 0 5 5 】

1 つの実施形態において、本発明の単離されたタンパク質 ( 好ましくは、H K I D - 1 タンパク質 ) は、これらのタンパク質における少なくとも 1 つの「プロテインキナーゼ A T P 結合部位」および少なくとも 1 つの「セリン / スレオニンプロテインキナーゼ活性部位」の存在に、ならびに配列番号 2 を含むアミノ酸配列に対する少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 8 %、9 9 %、またはそれより大きい相同性のアミノ酸配列を有することに基づいて、同定される。本明細書中において使用される場合、用語「プロテインキナーゼ A T P 結合部位」は、プロテインキナーゼにおいて保存される配列番号 2 4 のプロテインキナーゼ A T P 結合領域シグネチャー ( s i g n a t u r e ) 配列 ( P S 0 0 1 0 7 ) に対する有意なアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を含む。本明細書中において使用される場合、用語「セリン / スレオニンプロテインキナーゼ活性部位」は、タンパク質上のセリン残基およびスレオニン残基をリン酸化するプロテインキナーゼ中に保存される、配列番号 2 6 のセリン / スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー配列 ( P S 0 0 1 0 8 ) に対する有意なアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 5 6 】

別の実施形態において、本発明の単離されたタンパク質 ( 好ましくは、H K I D - 1 タンパク質 ) は、少なくとも 1 つの真核生物プロテインキナーゼドメインの存在に、および配列番号 2 を含むアミノ酸配列に対して少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 8 %、9 9 %、またはそれより大きい相同性のアミノ酸配列を有することに基づいて、同定される。本明細書中において使用される場合、用語「真核生物プロテインキナーゼドメイン」は、プロテインキナーゼにおい

10

20

30

40

50

て保存される、配列番号28の真核生物プロテインキナーゼドメイン配列(PF00069)に対する有意なアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を含む。

【0057】

本発明のなお別の実施形態は、配列番号3に少なくとも約43%（または45%、50%、55%、65%、75%、85%、90%、95%、または98%）同一な核酸分子を有するヌクレオチド配列によってコードされる、単離されたHKID-1タンパク質；配列番号2のアミノ酸260~263由来のcAMPおよびcGMPに依存するプロテインキナーゼリン酸化部位(PS00004；配列番号4)をコードする配列番号1の一部と、少なくとも約65%、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一なヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされる、単離されたHKID-1タンパク質；配列番号5；配列番号2のアミノ酸137~139、275~277、および279~281由来の3つのプロテインキナーゼCリン酸化部位(PS00005；配列番号6)；配列番号7~9；配列番号2のアミノ酸202~205、211~214、および321~324由来の3つのカゼインキナーゼIIリン酸化部位(PS00006；配列番号10)；配列番号11~13；配列番号2のアミノ酸33~40由来のチロシンキナーゼリン酸化部位(PS00007；配列番号14)；配列番号15；配列番号2のアミノ酸43~48、49~54、57~62、63~68、80~85、98~103、および295~300由来の7つのN-ミリスチル化部位(PS00008；配列番号16)；配列番号17~23；ならびに配列番号2のアミノ酸46~54由来のプロテインキナーゼATP結合領域シグネチャー(PS00107；配列番号24)をコードする配列番号1の一部に、少なくとも約65%、好ましくは、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一なヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされる、単離されたHKID-1タンパク質；配列番号25（例えば、配列番号1の約ヌクレオチド306~332；配列番号32）；配列番号2のアミノ酸166~178由来のセリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー(PS00108；配列番号26)；配列番号27（例えば、配列番号1の約ヌクレオチド666~704；配列番号33）；ならびに配列番号2のアミノ酸40~293由来の真核生物プロテインキナーゼドメイン(PS00069；配列番号28)；配列番号29（例えば、配列番号1の約ヌクレオチド288~1049；配列番号34）、および配列番号3のヌクレオチド配列を有する核酸分子にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされる、単離されたHKID-1タンパク質、またはこれらの相補体を含む。

10

20

30

【0058】

HKID-1タンパク質の生物学的に活性な部分は、HKID-1タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列）と実質的に同一であるかまたはこのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含み、このペプチドは、全長HKID-1タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、そしてHKID-1タンパク質の少なくとも1つの活性を示す。代表的に、生物学的に活性な部分は、HKID-1タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。HKID-1タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100またはそれ以上のアミノ酸長であるポリペプチドであり得る。生物学的に活性なポリペプチドは、1つ以上の同定されたHKID-1構造ドメイン（例えば、配列番号2の例えばアミノ酸260~263由来のcAMPおよびcGMPに依存するプロテインキナーゼリン酸化部位(PS00004；配列番号4)；配列番号5；例えば、配列番号2の例えばアミノ酸137~139、275~277、および279~281由来のプロテインキナーゼCリン酸化部位(PS00005；配列番号6)；配列番号7~9；例えば、配列番号2のアミノ酸202~205、211~214、および321~324由来のカゼインキナーゼIIリン酸化部位(PS00006；配列番号10)；配列番号11~13；例えば、配列番号2のアミノ酸33~40由来のチロシンキナーゼリン酸化部位(PS00007；配列番号14)；配列番号15；例えば、配列番号2のアミノ酸43~48、49~54、57~62

40

50

、63～68、80～85、98～103、および295～300由来のN-ミリスチル化部位(PS00008;配列番号16);配列番号17～23;例えば、配列番号2のアミノ酸46～54由来のプロテインキナーゼATP結合領域シグネチャー(PS00107;配列番号24);配列番号25;例えば、配列番号2のアミノ酸166～178由来のセリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー(PS00108;配列番号26);配列番号27;ならびに例えば、配列番号2のアミノ酸40～293由来の真核生物プロテインキナーゼドメイン(PS00069;配列番号28);配列番号29)を含む。

【0059】

さらに、他の生物学的に活性な部分(ここで、タンパク質の他の領域が欠失されている)は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブHKID-1タンパク質の1つ以上の機能的活性について評価され得る。

【0060】

HKID-1タンパク質は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する。他の有用なHKID-1タンパク質は、配列番号2と実質的に同一であり、そして天然の対立遺伝子改変または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なってもなお、配列番号2のタンパク質の機能的活性を保持する。例えば、このようなHKID-1のタンパク質およびポリペプチドは、本明細書中に記載される少なくとも1つの生物学的活性を有し、この生物学的活性は、例えば、以下である:(1)プロテインキナーゼによってリン酸化される能力、(2)N-ミリスチル化される能力、(3)ATPを結合する能力、(4)タンパク質をリン酸化する能力、(5)セリン残基およびスレオニン残基で特異的にタンパク質をリン酸化する能力、(6)HKID-1を発現する細胞(例えば、神経系の細胞)に関連するシグナル伝達経路において役割を果たす能力、(7)HKID-1が発現される細胞中で発現されるその基質タンパク質とタンパク質-タンパク質相互作用を形成する能力、ならびに(8)HKID-1が発現される細胞中に存在するシグナル伝達経路および生物学的経路において、タンパク質とタンパク質-タンパク質相互作用を形成する能力。従って、有用な単離されたHKID-1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも約45%同一、好ましくは55%、65%、75%、85%、90%、95%、96%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、そして配列番号2のHKID-1タンパク質の機能的活性を保持する、タンパク質である。他の例において、HKID-1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸260～263由来のcAMPおよびcGMPに依存するプロテインキナーゼリン酸化部位(PS00004;配列番号4)を1つ含む1つ以上のHKID-1ドメインと、55%、65%、75%、85%、90%、95%、96%、98%または99%同一なアミノ酸配列を有するタンパク質;配列番号5;配列番号2のアミノ酸137～139、275～277、および279～281由来の3つのプロテインキナーゼCリン酸化部位(PS00005;配列番号6);配列番号7～9;配列番号2のアミノ酸202～205、211～214、および321～324由来の3つのカゼインキナーゼIIリン酸化部位(PS00006;配列番号10);配列番号11～13;配列番号2のアミノ酸33～40由来の1つのチロシンキナーゼリン酸化部位(PS00007;配列番号14);配列番号15;配列番号2のアミノ酸43～48、49～54、57～62、63～68、80～85、98～103、および295～300由来の7つのN-ミリスチル化部位(PS00008;配列番号16);配列番号17～23;配列番号2のアミノ酸46～54由来の1つのプロテインキナーゼATP結合領域シグネチャー(PS00107;配列番号24);配列番号25;配列番号2のアミノ酸166～178由来の1つのセリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー(PS00108;配列番号26);配列番号27;ならびに配列番号2のアミノ酸40～293由来の1つの真核生物プロテインキナーゼドメイン(PF00069;配列番号28);配列番号29を有するタンパク質である。1つの実施形態において、HKID-1タンパク質は、配列番号2のHKID-1タンパク質の機能的活性を保持する。

【0061】

10

20

30

40

50

2つのアミノ酸配列のパーセント同一性または2つの核酸のパーセント同一性を決定するために、配列は、最適比較目的のために整列される(例えば、最適なアラインメントのために、第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列中の一方または両方に、ギャップが導入され得、そして比較の目的で、非相同配列が無視され得る)。好ましい実施形態において、比較の目的で整列される参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、なおより好ましくは少なくとも60%、そしてなおより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが、比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、分子は、その位置で同一である。(本明細書中において使用される場合、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と等価である。)2つの配列間のパーセント同一性は、これら2つの配列の最適な整列のために導入することが必要とされるギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数である。

10

20

30

40

50

#### 【0062】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい実施形態において、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)においてGAPプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsch((1970)J. Mol. Biol. 48:444-453)のアルゴリズムを用い、Blossum 62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびにギャップウェイト16、14、12、10、8、6、または4およびレングスウェイト(length weight)1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)のGAPプログラムを用い、NWsgapdna.CMPマトリクスならびにギャップウェイト40、50、60、70、または80およびレングスウェイト1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。特に好ましいセットのパラメータ(およびある分子が本発明の配列同一性内に入るか相同性の限度内に入るかを決定するために適用されるべきパラメータについて実施者が不確かである場合に使用されるべきパラメータ)は、Blossum 62スコアリングマトリクスを、ギャップオープンペナルティ-12、ギャップエクステンドペナルティ-4、およびフレームシフトギャップペナルティ-5で使用することである。

#### 【0063】

2つのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれたE. MeyersおよびW. Miller((1989)CABIOS, 4:11-17)のアルゴリズムを用い、PAM120ウェイトレジデュートーブル(weight residue table)、ギャップレングスペナルティ-12、およびギャップペナルティ-4を用いて決定され得る。

#### 【0064】

本明細書中に記載される核酸配列およびタンパク質配列は、公のデータベースに対して検索を実施して、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定するための、「問い合わせ配列」として使用され得る。このような検索は、Altschulら(1990)J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して実施され得る。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施されて、本発明のHKID-1核酸分子に対するヌクレオチド配列相同性を獲得し得る。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施されて、本発明のHKID-1タンパク質分子に対するアミノ酸配列相同性を獲得し得る。比較目的のためのギャップ化アラインメントを獲得するために、ギャップ化BLASTは

、Altschulら(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389~3402に記載されるように利用され得る。BLASTおよびギャップ化BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターが、使用され得る。www.ncbi.nlm.nih.govを参照のこと。

【0065】

2つの配列間のパーセント同一性は、ギャップを可能にしてかまたは可能にすることなく、上記と類似の技術を使用して決定され得る。パーセント同一性の計算において、正確な一致のみが計数される。

【0066】

本発明はまた、HKID-1キメラまたはHKID-1融合タンパク質を提供する。本明細書で使用される場合、HKID-1の「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非HKID-1ポリペプチドに作動可能に連結されるHKID-1ポリペプチドを含む。「HKID-1ポリペプチド」は、HKID-1に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、一方、「非HKID-1ポリペプチド」は、HKID-1タンパク質に実質的に同一でないタンパク質(例えば、HKID-1タンパク質と異なり、そして同じまたは異なる生物に由来するタンパク質)に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。HKID-1融合タンパク質において、HKID-1ポリペプチドは、HKID-1タンパク質の全てまたは一部、好ましくはHKID-1タンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分に対応し得る。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結される」は、HKID-1ポリペプチドおよび非HKID-1ポリペプチドがインフレームで互いに融合されることを示すことが意図される。非HKID-1ポリペプチドは、HKID-1ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

10

20

【0067】

1つの有用な単離された融合タンパク質は、HKID-1配列がGST配列のC末端に融合された、GST-HKID-1融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、組換えHKID-1の精製を容易にし得る。

【0068】

別の実施形態において、融合タンパク質は、そのN末端で異種シグナル配列を含むHKID-1タンパク質である。特定の宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)において、HKID-1の発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用を通じて増加され得る。例えば、バキュロウイルスエンベロープタンパク質のgp67分泌配列は、異種シグナル配列として使用され得る(*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubelら編、John Wiley & Sons, 1992)。真核生物異種シグナル配列の他の例には、メリチンおよびヒト胎盤アルカリホスファターゼの分泌配列が挙げられる(*Stratagene*; La Jolla, California)。なお別の例において、有用な原核生物異種シグナル配列には、phoA分泌シグナル(Sambrookら、前出)およびプロテインA分泌シグナル(*Pharmacia Biotech*; Piscataway, New Jersey)が挙げられる。

30

40

【0069】

なお別の実施形態において、融合タンパク質は、HKID-1-イムノグロブリン融合タンパク質であり、これは、HKID-1の全てまたは一部がイムノグロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合される。

【0070】

好ましくは、本発明のHKID-1キメラタンパク質またはHKID-1融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術によって生成される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントは、従来技術に従って(例えば、連結のために平滑末端または付着末端(staggered-end)を使用すること、適切な末端を提供するための制限酵素消化、望ましくない結合を避けるための適切なアルカリホスファターゼ処

50

理のような付着末端 (cohesive end) の埋まり (filling-in)、および酵素的連結によって) インフレーションとともに連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化 DNA 合成機を含む従来の技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントの PCR 増幅は、引き続いてキメラ遺伝子配列を生成するためにアニール化され、そして再増幅され得る 2 つの連続する遺伝子フラグメント間の相補的突出部を生じるアンカープライマーを使用して実施され得る (例えば、Ausubelら、前出を参照のこと)。さらに、多くの発現ベクターは、すでに融合部分 (例えば、GST ポリペプチド) をコードして市販されている。HKID-1 をコードする核酸は、このような発現ベクターへクローン化され得、その結果、融合部分は、インフレーションで HKID-1 タンパク質に連結される。

10

#### 【0071】

本発明はまた、HKID-1 タンパク質の改変体 (すなわち、HKID-1 アミノ酸配列の配列とは異なる配列を有するタンパク質) を提供する。このような改変体は、HKID-1 アゴニスト (模倣物) または HKID-1 アンタゴニストのいずれかとして機能し得る。HKID-1 タンパク質の改変体は、変異誘発 (例えば、HKID-1 タンパク質の個々の点変異または切断) によって、生成され得る。HKID-1 タンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態の HKID-1 タンパク質の生物学的活性 (例えば、(1) タンパク質キナーゼによりリン酸化される能力、(2) N-ミリスチル化される能力、(3) ATP に結合する能力、(4) タンパク質をリン酸化する能力、(5) セリン残基およびスレオニン残基上でタンパク質を特異的にリン酸化する能力、(6) HKID-1 を発現する細胞 (例えば、神経系の細胞) と関連するシグナル伝達経路において役割を果たす能力、(7) HKID-1 が発現される細胞において発現されるその基質タンパク質との、タンパク質-タンパク質相互作用を形成する能力、ならびに (8) HKID-1 が発現される細胞に存在するシグナル伝達経路および生物学的経路におけるタンパク質とのタンパク質-タンパク質相互作用を形成する能力) と実質的に同じであるか、またはそのサブセットであり得る。HKID-1 タンパク質のアンタゴニストは、例えば、HKID-1 タンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流メンバーまたは上流メンバーに競合的に結合することによって、天然に存在する形態の HKID-1 タンパク質の活性の 1 つ以上を阻害し得る。従って、特定の生物学的効果が、限定される機能の改変体での処置により引き起こされ得る。天然に存在する形態のタンパク質の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、天然に存在する形態の HKID-1 タンパク質を用いる処置と比較して、被験体における副作用がより少なくあり得る。

20

30

#### 【0072】

処置は、患者への治療剤の適用もしくは投与、または患者から単離した組織もしくは細胞株への治療剤の適用もしくは投与と定義され、この患者は、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を有し、この適用または投与は、この疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を、治療するか、治癒するか、活性化するか、軽減するか、変更するか、改善するか、回復するか、改善するかまたは影響を与える目的で行われる。本明細書中で使用する場合、「被験体」とは、哺乳動物 (例えば、ヒト)、または実験動物もしくは疾患モデルをいい得る。この被験体はまた、非ヒト動物 (例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、または他の家畜) であり得る。治療剤としては、小分子、ペプチド、抗体、リボザイムおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0073】

HKID-1 アゴニスト (模倣物) として、または HKID-1 アンタゴニストとしてのいずれとして機能する HKID-1 タンパク質の改変体は、HKID-1 タンパク質のアゴニスト活性もしくはアンタゴニスト活性についての HKID-1 タンパク質の変異体 (例えば、短縮化変異体) のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定され得る。1 つの実施態様において、HKID-1 改変体の変化を与えた (variaged) ライブラリーは、核酸レベルでコンビナトリアルな変異誘発により生成され、そして変化を与えられた遺伝子ライブラリーによりコードされる。HKID-1

50

改変体の変化を与えられたライブラリーは、潜在的なHKID-1配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいはそこにあるHKID-1配列のセット（例えば、ファージディスプレイのための）を含むより大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、例えば、遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に連結することにより生成され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なHKID-1改変体のライブラリーを生成するために使用され得る種々の方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動化DNA合成機で行われ得、次いで、合成遺伝子が適切な発現ベクターに連結され得る。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なHKID-1配列の所望のセットをコードする配列の全ての供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は、当該分野で公知である（例えば、Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら (1984) Science 198:1056; Ikeら (1983) Nucleic Acids Res. 11:477を参照のこと）。

#### 【0074】

さらに、HKID-1タンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを使用して、スクリーニングおよび引き続いてHKID-1タンパク質の改変体の選択のための、変化を与えたHKID-1フラグメントの集団を生成し得る。1つの実施態様において、コード配列フラグメントのライブラリーは、HKID-1コード配列の二本鎖PCRフラグメントを、ニックが1分子につき約1回だけ生じる条件下でヌクレアーゼで処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを異なるニック化産物由来のセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するように再生し、S1ヌクレアーゼでの処理によって再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成され得る。この方法によって、この発現ライブラリーが誘導され得、このライブラリーは、HKID-1タンパク質の種々のサイズのN末端フラグメントおよび内部フラグメントをコードする。

#### 【0075】

点変異または短縮化により作製されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングし、そして選択された特性を有する遺伝子産物についてのcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術は、当該分野で公知である。このような技術は、HKID-1タンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングのために適合される。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広範に使用される技術（これは、高スループット分析になじみやすい）としては、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングし、適切な細胞を、得られるベクターのライブラリーで形質転換し、そして所望の活性の検出が、その産物が検出される遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現することが挙げられる。ライブラリーにおける機能的変異体の頻度を増強する技術である反復的な全体変異誘発（recursive ensemble mutagenesis）（REM）をスクリーニングアッセイとの組み合わせで使用して、HKID-1改変体を同定し得る（ArkinnおよびYourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgraveら (1993) Protein Engineering 6(3):327-331）。

#### 【0076】

配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドの全体的に機能的なタンパク質、部分的に機能的なタンパク質、または非機能的タンパク質を含む、天然に存在する対立遺伝子改変体である単離されたポリペプチドもまた、本発明の範囲内であり、ここでこのポリペプチドは、配列番号1、配列番号3またはその相補体を含む核酸分子に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。HKID-1の対立遺伝子改変体は、遺伝子によってコードされ、この遺伝子は、D22S1169とD22S q

ter マーカーとの間の第 22 染色体であり、この第 22 染色体の連結部分の上から 196.70 centiRay にあることが実施例 5 で示されている HKID-1 の遺伝的かつ物理的位置に物理的かつ遺伝子的マッピングされる。

【0077】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、HKID-1 の種オルソログである単離されたポリペプチドもまた、本発明の範囲内であり、このポリペプチドは、配列番号 1、配列番号 3 またはその相補体を含む核酸分子に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされる。HKID-1 の種オルソログは、これらが由来するゲノムの、D22S1169 と D22S qter マーカーとの間のヒト第 22 染色体にシニターであり、この第 22 染色体の連結基の上から 196.70 centiRay である領域に、しばしば物理的かつ遺伝的にマッピングされる。

【0078】

(III. 抗 HKID-1 抗体)

本発明は、本発明の HKID-1 タンパク質に結合する抗体を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫学的に活性な免疫グロブリン分子の一部（すなわち、抗原を特異的に結合する抗原結合部位を含む分子（例えば、HKID-1））をいう。HKID-1 に特異的に結合する分子は、HKID-1 を結合する分子であるが、天然に HKID-1 を含むサンプル（例えば、生物学的サンプル）中の他の分子とは実質的に結合しない。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、酵素（例えば、ペプシン）で抗体を処理することにより生成され得る F(ab) フラグメントおよび F(ab')<sub>2</sub> フラグメントが挙げられる。本発明は、HKID-1 を結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」とは、本明細書中で使用される場合、HKID-1 の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の 1 種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的には、これが免疫反応する特定の HKID-1 タンパク質に対する単一の結合親和性を提示する。

【0079】

単離された HKID-1 タンパク質、またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を使用して、HKID-1 を結合する抗体を作製するために、免疫原として使用され得る。全長 HKID-1 タンパク質が、用いられエルカ、あるいは、本発明は、免疫源として使用するための HKID-1 の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。HKID-1 の抗原性ペプチドは、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の少なくとも 8（好ましくは、10、15、20 または 30）のアミノ酸残基を含み、かつ HKID-1 のエピトープを包含し、その結果、このペプチドに対して惹起された抗体は、HKID-1 との特異的免疫複合体を形成する。

【0080】

抗原性ペプチドにより含まれるエピトープは、タンパク質の表面に位置する HKID-1 の領域である。ヒト HKID-1 タンパク質のポリペプチド配列（配列番号 2）の、図 3 に示される表面確率分析は、以下の可能な抗原性領域；アミノ酸 28~39、アミノ酸 124~129 およびアミノ酸 277~283 が、このタンパク質の表面に存在する可能性が特に高く、従って、抗体作製の標的化のために有用な表面残基をコードする可能性があることを同定する。

【0081】

AN HKID-1 免疫原は、代表的に、適切な被験体（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の動物）をこの免疫原で免疫することによって、抗体を調製するために使用される。適切な免疫原の調製は、例えば、組換え発現された HKID-1 タンパク質または化学的に合成された HKID-1 ポリペプチドを含み得る。この調製物は、さらに、アジュバンド（例えば、フロイト完全アジュバンドもしくはフロイト不完全アジュバンド、または類似の免疫刺激剤）を含み得る。適切な被験体の免疫原性 HKID-1 調製物での免疫は、ポリクローナル抗 HKID-1 抗体応答を誘発する。

## 【0082】

ポリクローナル抗HKID-1抗体は、適切な被験体をHKID-1免疫原で免役することによって、上記の様にして調製され得る。この免疫された被験体における抗HKID-1抗体の力価は、標準的な技術によって（例えば、固定化HKID-1を使用する酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を用いて）、経時的にモニタリングされ得る。所望の場合、HKID-1に対して指向される抗体分子を、哺乳動物から（例えば、血液から）単離し得、そしてさらに、周知の技術（例えば、IgG画分を得るためのプロテインAクロマトグラフィー）により精製し得る。免疫後、適切な時間に、例えば、抗HKID-1抗体の力価が最も高いときに、抗体生成細胞を被験体から獲得し得、そしてこれを使用して、標準的技術（例えば、初めは、KohlerおよびMilstein（1975）Nature 256:495-497により記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら（1983）Immunol. Today 4:72）、EBVハイブリドーマ技術（Coleら（1985）、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁）またはトリオマ（trioma）技術）によりモノクローナル抗体を調製し得る。ハイブリドーマを生成する技術は、周知である（一般には、Current Protocols in Immunology（1994）Coliganら（編）、John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照のこと）。簡潔には、不死化細胞株（代表的には骨髓腫細胞）を、上記のようにHKID-1免疫原で哺乳動物由来の免疫したリンパ球（代表的には、脾臓細胞）と融合し、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、HKID-1を結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを同定する。

## 【0083】

リンパ球と不死化細胞株とを融合するために使用される任意の多くの周知のプロトコルは、抗HKID-1モノクローナル抗体を生成する目的で適用され得る（例えば、Current Protocols in Immunology、前出；Galfreら（1977）Nature 266:550-52；R.H.Kenneth、Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York（1980）；およびLerner（1981）Yale J. Biol. Med., 54:387-402を参照のこと）。さらに、当業者は、このような方法の多くのバリエーションが存在し、これらがまた有用であることを理解する。代表的には、不死化細胞株（例えば、骨髓腫細胞株）はリンパ球と同じ哺乳動物種に由来する。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物を免疫したマウス由来のリンパ球と不死化マウス細胞株（例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養培地（「HAT培地」）に感受性である骨髓腫細胞株）とを融合することにより作製され得る。多くの骨髓腫細胞株のうち任意のものが、標準的技術に従う融合パートナーとして使用され得る（例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/O-Ag14骨髓腫株）。これらの骨髓腫株は、ATCCから入手可能である。代表的には、HAT感受性マウス骨髓腫細胞を、ポリエチレングリコール（「PEG」）を使用してマウス脾臓細胞に融合する。次いで、融合から得られたハイブリドーマ細胞を、HAT培地を用いて選択する（このことにより、融合していない細胞および生成性でない融合骨髓腫細胞は死ぬ（融合していない脾臓細胞は、形質転換していないので数日後に死ぬ））。本発明のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞は、HKID-1を結合する抗体について、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより（例えば、標準的ELISAアッセイを使用して）検出される。

## 【0084】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製するかわりに、モノクローナル抗HKID-1抗体を同定し得、そして組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例え

ば、抗体ファージディスプレイライブラリー)を、HKID-1を用いてスクリーニングすることにより単離し得、それによってHKID-1を結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離し得る。ファージディスプレイライブラリーを生成し、そしてスクリーニングするためのキットは、市販されている(例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号27-9400-01; およびthe Stratagene SurfZAP<sup>TM</sup> Phage Display Kit, カタログ番号240612)。さらに、抗体ディスプレイライブラリーを生成し、そしてスクリーニングする際の使用に特になじみやすい方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5,223,409号; PCT公開番号WO92/18619; PCT公開番号WO91/17271; PCT公開番号WO92/20791; PCT公開番号WO92/15679; PCT公開番号WO93/01288; PCT公開番号WO92/01047; PCT公開番号WO92/09690; PCT公開番号WO90/02809; Fuchsら(1991)Bio/Technology 9:1370-1372; Hayら(1992)Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huseら(1989)Science 246:1275-1281; Griffithsら(1993)EMBO J. 12:725-734に見出され得る。

#### 【0085】

さらに、ヒトおよび非ヒト部分の両方を含む組換え抗HKID-1抗体(例えば、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体)は、本発明の技術範囲内であり、これは、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により(例えば、PCT公開番号WO87/02671; 欧州特許出願184,187号; 欧州特許出願171,496号; 欧州特許出願173,494号; PCT公開番号WO86/01533; 米国特許第4,816,567号; 欧州特許出願125,023号; Betterら(1988)Science 240:1041-1043; Liuら(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら(1987)J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら(1987)Canc. Res. 47:999-1005; Woodら(1985)Nature 314:446-449; およびShawら(1988)J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison(1985)Science 229:1202-1207; Oiら(1986)Bio/Techniques 4:214; 米国特許第5,225,539号; Jonesら(1986)Nature 321:552-525; Verhoeyanら(1988)Science 239:1534; およびBeidlerら(1988)J. Immunol. 141:4053-4060に記載される方法を使用して)生成され得る。

#### 【0086】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のために特に望ましい。このような抗体は、内因性免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現できないが、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて生成され得る。このトランスジェニックマウスは、選択された抗原(例えば、HKID-1の全てまたは一部分)を用いて通常の様式で免疫される。この抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて得られ得る。トランスジェニックマウスにより保有されるこのヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再配置され、そして続いてクラススイッチおよび体細胞変異を受ける。従って、このような技術を用いて、治療的に有用なIgG、IgAおよびIgE抗体を生成することは可能である。ヒト抗体を生成するためのこの技術の概観については、LonbergおよびHuszar(1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生成することに関するこの技術ならびにそのような抗体を生成するためのプロトコールについ

ての詳細な議論については、例えば、米国特許第5,625,126号；米国特許第5,633,425号；米国特許第5,569,825号；米国特許第5,661,016号；および米国特許第5,545,806号を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)のような会社は、上記に記載の技術に類似の技術を使用する選択された抗体に対して指向されるヒト抗体を提供することを保証し得る。

【0087】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体は、「導かれた選択」として言及される技術を用いて生成され得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）を使用して、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を導く。

10

【0088】

第1に、選択された抗原（エピトープ）を結合する非ヒトモノクローナル抗体（例えば、HKID-1活性を阻害する抗体）が同定される。非ヒト抗体の重鎖および軽鎖はクローニングされ、そしてこれを使用してファージディスプレイFabフラグメントを作製する。例えば、重鎖遺伝子は、重鎖が細菌から分泌され得るように、プラスミドベクターへクローニングされ得る。軽鎖遺伝子は、軽鎖がファージの表面上に発現され得るように、ファージコートタンパク質遺伝子にクローニングされ得る。ファージに融合したヒト軽鎖レポーター（無作為収集物）を使用して、非ヒト重鎖を発現する細菌に感染させる。得られる子孫ファージは、ハイブリッド抗体（ヒト軽鎖/非ヒト重鎖）を提示する。選択された抗原をパニングスクリーニングにおいて使用して、選択された抗原に結合するファージを選択する。このようなファージを同定するために、数回の選択が必要であり得る。次いで、ヒト軽鎖遺伝子は、選択された抗原を結合する選択されたファージから単離される。次いで、これらの選択されたヒト軽鎖遺伝子を使用して、以下のとおり、ヒト重鎖遺伝子の選択を導く。選択されたヒト軽鎖遺伝子は、細菌による発現のためにベクターに挿入される。選択されたヒト軽鎖を発現する細菌を、ファージに融合されたヒト重鎖のレポーターで感染させる。得られる子孫ファージは、ヒト抗体（ヒト軽鎖/ヒト重鎖）を提示する。

20

【0089】

次いで、選択された抗原をパニングスクリーニングにおいて使用して、選択された抗原を結合するファージを選択する。この工程で選択されたファージは、最初に選択された非ヒトモノクローナル抗体により認識される同じエピトープを認識する完全なヒト抗体を提示する。重鎖および軽鎖の両方をコードする遺伝子は、容易に単離され、そしてヒト抗体を生成するためにさらに操作され得る。この技術は、Jespersら(1994, Bio/Technology 12:899-903)に記載される。

30

【0090】

抗HKID-1抗体（例えば、モノクローナル抗体）を使用して、標準的技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィーもしくは免疫沈降）によりHKID-1を単離し得る。抗HKID-1抗体は、細胞からの天然のHKID-1および宿主細胞中で発現される、組換え生成されたHKID-1の生成を容易にし得る。さらに、抗HKID-1抗体を使用して、HKID-1タンパク質の発現量および発現パターンを評価するために、HKID-1タンパク質（例えば、細胞溶解物または細胞上清において）を検出し得る。抗HKID-1抗体を、例えば、診断的に使用して、（例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために）臨床試験手順の一部として、組織中のタンパク質レベルをモニターし得る。検出可能な物質に抗体を結合することにより、検出は容易になり得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射活性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニラミン(d

40

50

ichlorotriazinylamine)、フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ;発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ;生物発光物質としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ、そして適切な放射活性物質の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

#### 【0091】

(IV.組換え発現ベクターおよび宿主細胞)

本発明は、さらに、本発明のHKID-1タンパク質をコードする核酸またはその一部を含むベクター、好ましくは、発現ベクターを提供する。

#### 【0092】

本明細書中で用いられる場合、用語「ベクター」とは、それに連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。1つの型のベクターは、「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントを連結し得る環状二本鎖DNAループをいう。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、ここで、さらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自発的に複製し得る(例えば、細菌の複製起点を有するウイルスベクターまたはエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に、宿主細胞のゲノムへと組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターである発現ベクターは、それらに作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。一般に、発現ベクターの組換えDNA技術における有用性は、しばしばプラスミド(ベクター)の形態である。しかし、本発明は、このような他の形態の発現ベクター(例えば、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)、これらは等価な機能に貢献する)を含むように意図される。

#### 【0093】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適する形態で含む。これは、この組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結されている、発現のために用いられるべき宿主細胞を基礎に選択された1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結された」は、目的のヌクレオチド配列が、調節配列(単数または複数)に、ヌクレオチド配列の発現を可能にするような様式(例えば、インビトロ転写/翻訳系において、またはベクターが宿主細胞中に導入されるとき宿主細胞において)で連結されていることを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよびその他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、Goeddel、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、CA(1990)に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞でヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞でのみヌクレオチド配列の発現を指向する配列(例えば、組織特異的調節配列)を含む。発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に認識される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞中に導入され得、それによって本明細書に記載されるような核酸によってコードされる、融合タンパク質またはペプチド(例えば、HKID-1タンパク質、HKID-1タンパク質の変異形態、融合タンパク質など)を含む、タンパク質またはペプチドを生成する。

#### 【0094】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞におけるHKID-1タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、HKID-1タンパク質は、E.coliのような細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを用いる)、酵母細胞、または哺乳動物細胞中で発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel(前出)でさらに論議されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調

10

20

30

40

50

節配列およびT7ポリメラーゼを用いてインビトロで転写および翻訳され得る。

【0095】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成性プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを用い、E. coli中で最も頻繁に実施される。融合ベクターは、多くのアミノ酸を、その中にコードされるタンパク質に（通常、組換えタンパク質のアミノ末端に）付加する。代表的には、このような融合タンパク質は、3つの目的の役に立つ：1）組換えタンパク質の発現を増加すること；2）組換えタンパク質の溶解度を増加すること；および3）アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製を支援すること。しばしば、融合発現ベクターにおいては、タンパク質切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との融合の接続部に導入され、この融合タンパク質の精製の次に融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にする。このような酵素、およびそれらの同族起源の認識配列は、第Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAをそれぞれ標的組換えタンパク質に融合する、pGEX（Pharmacia Biotech Inc；SmithおよびJohnson（1988）Gene 67：31-40）、pMAL（New England Biolabs、Beverly、MA）およびpRIT5（Pharmacia、Piscataway、NJ）を含む。

【0096】

適切な誘導性非融合E. coli発現ベクターの例としては、pTrc（Amannら（1988）Gene 69：301-315）およびpET 11d（Studierら、Gene Expression Technology：Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、California（1990）60-89）が挙げられる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存する。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現されたウイルスRNAポリメラーゼ（T7 gn1）によって媒介されるT7 gn10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV5プロモーターの転写制御下にT7 gn1遺伝子を有する、常在性プロファージ由来の宿主株BL21（DE3）またはHMS174（DE3）によって補充される。

【0097】

E. coliにおいて組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解性切断する減弱した能力を有する宿主細菌中でタンパク質を発現することである（Gottesman Gene Expression Technology：Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、California（1990）119-128）。別の戦略は、各アミノ酸に対する個々のコドンがE. coli中で優先的に利用されるものであるように、発現ベクター中に挿入されるべき核酸の核酸配列を変更することである（Wadaら（1992）Nucleic Acids Res. 20：2111-2118）。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的DNA合成技術によって行われ得る。

【0098】

別の実施形態において、HKID-1発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母S. cerevisiaeにおける発現のためのベクターの例としては、pYepSec1（Baldarira（1987）EMBO J. 6：229-234）、pMFa（KurjanおよびHerskowitz（1982）Cell 30：933-943）、pJRY88（Schultzら（1987）Gene 54：113-123）、pYES2（Invitrogen Corporation、San Diego、CA）およびpPicZ（Invitrogen Corp. San Diego、CA）が挙げ

られる。

【0099】

あるいは、HKID-1は、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）におけるタンパク質の発現に適切なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ（Smithら（1983）Mol. Cell Biol. 3:2156-2165）およびpVLシリーズ（LucklowおよびSummers（1989）Virology 170:31-39）が挙げられる。

【0100】

なお別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8（Seed（1987）Nature 329:840）およびpMT2PC（Kaufmanら（1987）EMBO J. 6:187-195）が挙げられる。哺乳動物細胞中で用いられる場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス調節エレメントにより提供される。例えば、一般に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方に適切な他の発現系については、Sambrook、J.ら、前出の第16章および第17章を参照のこと。

【0101】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントが核酸の発現に使用される）。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertら（1987）Genes Dev. 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）Adv. Immunol. 43:235-275）、T細胞レセプターの特異的プロモーター（WinotoおよびBaltimore（1989）EMBO J. 8:729-733）、および免疫グロブリン（Banerjiら（1983）Cell 33:729-740；QueenおよびBaltimore（1983）Cell 33:741-748）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら（1985）Science 230:912-916）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清ホエープロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州特許出願公開番号264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーター（例えば、マウスhoxプロモーター（KesselおよびGruss（1990）Science 249:374-379）および - フェトプロテインプロモーター（CampesおよびTilghman（1989）Genes Dev. 3:537-546））もまた、含まれる。

【0102】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、このDNA分子は、（DNA分子の転写によって）HKID-1 mRNAに対してアンチセンスのRNA分子の発現を可能にする様式で、調節配列に作動可能に連結される。アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結された調節配列が、選択され得、この調節配列は、種々の細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続した発現を指向し、例えば、アンチセンスRNAの構成的な、組織特異的なまたは細胞型特異的な発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび/もしくはウイルスエンハンサー、または調節配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が高効率調節領域の制御下で産生される、組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態であり得、その活性は、これらのベクターが導入される細胞型により決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発

10

20

30

40

50

現の調節の考察については、Weintraubら、(Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1 (1) 1986)を参照のこと。

【0103】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入される宿主細胞の使用に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の被験細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいう。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変は次の世代において存在し得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でなくてもよく、本明細書中で使用されるようなこの用語の範囲内になお含まれる。

【0104】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、HKID-1タンパク質は、細菌細胞(例えば、E. coli)、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞(例えば、チャニーズハムスター卵巣細胞(CHO)またはCOS細胞)で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0105】

ベクターDNAは、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸(例えば、DNA)を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウム共沈殿もしくは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrookら(前出)、および他の実験説明書において見出され得る。

【0106】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、小さい割合の細胞のみが、そのゲノム中に外来のDNAを組み込み得ることが公知である。これらの組み込みを同定および選択するために、選択マーカー(例えば、抗生物質に対する耐性)をコードする遺伝子が、一般に、目的の遺伝子と共に宿主細胞に導入される。選択マーカーとしては、薬物(例えば、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキセート)に対する耐性を付与するものが挙げられる。選択マーカーをコードする核酸は、HKID-1をコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、または別個のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定され得る(例えば、選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は、生存するが、他の細胞は死滅する)。

【0107】

本発明の宿主細胞(例えば、培養物中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞)は、HKID-1タンパク質を生成する(すなわち、発現する)ために使用され得る。従って、本発明は、本発明の宿主細胞を用いてHKID-1タンパク質を産生する方法をさらに提供する。1つの実施形態では、この方法は、本発明の宿主細胞(これにHKID-1をコードする組換え発現ベクターが導入されている)を、適切な培地中で、HKID-1タンパク質が産生されるように培養する工程を包含する。別の実施形態では、この方法は、上記培地または宿主細胞からHKID-1を単離する工程をさらに包含する。

【0108】

本発明の宿主細胞をまた使用して、非ヒトトランスジェニック動物を作製し得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、受精卵または胚性幹細胞であり、この細胞に、HKID-1コード配列が導入される。次いで、このような宿主細胞を使用して、非ヒトトランスジェニック動物を作製し得、ここにおいて、外因性のHKID-1配列が、それらのゲノムまたは相同な組換え動物に導入され、ここで、内因性のHKID-1配列が、変更される。このような動物は、HKID-1の機能および/または活性を研究するため、ならびにHKID-1活性のモジュレーターを同定および/または評価するた

10

20

30

40

50

めに、有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、非ヒト動物であり、好ましくは、哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのようなげっ歯類であり、ここで、これらの動物の1つ以上の細胞が、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、外因性DNAであり、この外因性DNAは、トランスジェニック動物が成長する細胞のゲノムに取り込まれ、かつ成熟動物のゲノムにおいて維持され、それによってこのトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織における、コードされた遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同な組換え動物」は、非ヒト動物であり、好ましくは、哺乳動物であり、より好ましくは、マウスであり、ここで、内因性のHKID-1遺伝子は、この内因性遺伝子と、動物の成長前にこの動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入される外因性DNA分子との間の相同組換えによって変更される。

#### 【0109】

本発明のトランスジェニック動物は、HKID-1のコード核酸を、受精卵の雄前核に、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって導入し、そして卵母細胞を偽妊娠雌養母動物において成長させることによって作製され得る。HKID-1のcDNA配列（例えば、配列番号1または配列番号3の配列）は、導入遺伝子として、非ヒト動物のゲノムに導入され得る。あるいは、ヒトのHKID-1遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスHKID-1遺伝子）は、ヒトHKID-1のcDNAへのハイブリダイゼーションに基づいて単離され得、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現の効力を増加させるように、この導入遺伝子に含まれ得る。組織特異的調節配列は、HKID-1導入遺伝子に作動可能に連結されて、HKID-1タンパク質の発現を特定の細胞に指向し得る。胚操作およびマイクロインジェクションを介して、トランスジェニック動物（特に、マウスのような動物）を作製するための方法は、当該分野において慣習的であり、例えば、以下に記載されている：米国特許第4,736,866号および同第4,870,009号、米国特許第4,873,191号、ならびにHogan, Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。類似の方法が、他のトランスジェニック動物の作製のために使用され得る。トランスジェニックファウンダー（founder）動物は、そのゲノムにおけるHKID-1導入遺伝子の存在、および/あるいは動物の組織または細胞におけるHKID-1 mRNAの発現に基づいて、同定され得る。次いで、トランスジェニックファウンダー動物を使用して、導入遺伝子を保有するさらなる動物を産出し得る。さらに、HKID-1をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物はさらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物を産出し得る。

#### 【0110】

相同な組換え動物を作製するために、HKID-1遺伝子（例えば、HKID-1遺伝子（例えば、マウスHKID-1遺伝子）のヒトホモログまたは非ヒトホモログ）の少なくとも一部を含むベクターが調製され、このベクターに、欠失、付加または置換が導入されて、それによって、HKID-1遺伝子に変更される（例えば、機能的に破壊される）。1つの実施形態において、ベクターは、相同組換えの際に、内因性のHKID-1遺伝子が機能的に破壊される（すなわち、もはや機能的タンパク質をコードしない；「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる）ように、設計される。あるいは、ベクターは、相同組換えの際に、内因性のHKID-1遺伝子に変異されるか、さもなければ変更されるが依然として機能的タンパク質をコードする（例えば、上流の調節領域が変更され、それによって内因性のHKID-1タンパク質の発現を変更し得る）ように、設計され得る。相同な組換えベクターにおいて、HKID-1遺伝子の変更された部分は、HKID-1遺伝子のさらなる核酸配列によって、その5'末端および3'末端に隣接し、ベクターによって保有される外因性のHKID-1遺伝子と、胚性幹細胞における内因性HKID-1遺伝子

との間に、相同組換えが生じることを可能にする。さらなる隣接のHKID-1核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さの核酸である。代表的には、隣接したDNA(5'末端と3'末端との両方)の数キロベースが、このベクターに含まれる(例えば、相同組換えベクターの記載については、ThomasおよびCapecci(1987)Cell 51:503を参照のこと)。ベクターは、胚性幹細胞株に、(例えば、エレクトロポーションによって)導入され、そして導入されたHKID-1遺伝子が内因性のHKID-1遺伝子と相同に組み換わる細胞が、選択される(例えば、Liら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。次いで、この選択された細胞は、動物(例えば、マウス)の胚盤胞に注射され、凝集キメラを形成し得る。(例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson編(IRL, Oxford, 1987)113-152頁)を参照のこと)。次いで、キメラ胚は、適切な偽妊娠雌養母動物に移植され得、そしてこの胚は、生殖(term)され得る。生殖細胞において相同組換えされたDNAを含む子孫を使用して、動物を繁殖させ得、ここにおいて、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって相同組換えされたDNAを含む。相同な組換えベクターおよび相同な組換え動物を構築するための方法は、以下にさらに記載される: Bradley(1991)Current Opinion in Bio/Technology 2:823-829、PCT国際公開番号WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968およびWO 93/04169。

10

20

#### 【0111】

別の実施形態において、トランスジェニック非ヒト動物が作製され得、これは、導入遺伝子の調節された発現を可能にする、選択された系を含む。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksora(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gormanら(1991)Science 251:1351-1355)。cre/loxPリコンビナーゼ系を使用して導入遺伝子の発現を調節する場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要とされる。このような動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築によって(例えば、2種のトランスジェニック動物(一方は、選択されたタンパク質をコードするトランスジーンを含み、他方は、リコンビナーゼをコードするトランスジーンを含む)を交配させることによって)提供され得る。

30

#### 【0112】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、Wilmutら、(1997)Nature 385:810-813およびPCT公報番号WO 97/07668およびWO 97/07669に記載される方法に従って産生され得る。まとめると、トランスジェニック動物に由来する細胞(例えば、体細胞)は、単離され得、そして増殖サイクルを出てG<sub>0</sub>期に入るように誘導され得る。次いで、静止細胞は、例えば、電気パルスの使用によって、静止細胞が単離されたのと同じ種の動物に由来する、徐核した卵母細胞に融合され得る。次いで、再構築された卵母細胞は、桑実胚または胚盤胞に発達するように培養され、次いで、偽妊娠の雌性里親(foster)動物に移植される。この雌性里親動物の子孫は、細胞(例えば、体細胞)が単離された動物のクローンである。

40

#### 【0113】

(V. 薬学的組成物)

本発明のHKID-1核酸分子、HKID-1タンパク質、および抗HKID-1抗体(本明細書中で「活性化合物」ともいわれる)は、投与に適切な薬学的組成物中に取り込まれ得る。このような組成物は、代表的には、核酸分子、タンパク質、または抗体および薬

50

学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、言語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与に適合性の任意および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤ならびに吸収遅延剤などを含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野において周知である。任意の従来媒体または薬剤がこの活性化化合物と非適合性である範囲を除いて、この組成物におけるそれらの使用が意図される。補助的な活性化化合物はまた、この組成物中に取り込まれ得る。

#### 【0114】

本発明の薬学的組成物は、投与のその意図された経路と適合性であるように処方される。投与の経路の例には、非経口投与（例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与）、経口投与（例えば、吸入投与）、経皮投与（局所投与）、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用または皮下適用に使用される溶液または懸濁液には、以下の成分が挙げられ得る：滅菌希釈剤（例えば、注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、アセテート、シトレート、またはホスフェート）、および張度を調整するための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）で調節され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックから作製されるアンプル、使い捨てシリンジ、または複数用量のバイアル中に含まれ得る。

10

20

#### 【0115】

注射用の使用に適切な薬学的組成物は、滅菌注射溶液または分散液の即時調製物のための滅菌水溶液（ここでは水溶性）または分散液、および滅菌粉末を含む。静脈内注射については、適切なキャリアには、生理学的な生理食塩水、静菌水、Cremophor EL<sup>TM</sup>（BASF; Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合では、この組成物は、滅菌されなければならない、そして容易なシリンジ能力（syringability）が存在する程度にまで流動的にされるべきである。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保存されなければならない。このキャリアは、溶媒または分散培地（例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなどを含む）、ならびにそれらの安定な混合物であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール）、ソルビトール、塩化ナトリウム）をこの組成物中に含むことが好ましい。注射用組成物の延長した吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）をこの組成物中に含むことによって、もたらされ得る。

30

40

#### 【0116】

滅菌注射用溶液は、活性化化合物（例えば、HKID-1タンパク質または抗HKID-1抗体）を、上記で列挙した成分の1以上の組合せで、必要とされる量において適切な溶媒中に取り込ませ、必要とされる場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散剤は、活性化化合物を、基本的な分散媒体および上記に列挙された成分のうちの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に取り込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の方法は、減圧乾燥および凍結乾燥であり、これらは、活性成分の粉末およびその以前に滅菌濾過された溶液からの任意のさらなる所望の成分を生じる。

#### 【0117】

50

経口組成物は、一般に、不活性な希釈剤または食用キャリアを含む。それらは、ゼラチンカプセル中に含まれるか、または錠剤へと圧縮される。経口治療投与のために、この活性化合物は、賦形剤とともに取り込まれ、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用される。経口組成物はまた、口内洗浄としての使用のための流体キャリアを使用して調製され得、ここでこの流体キャリア中の化合物は、経口で適用され、そして口内洗浄され (swish)、吐き出されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント物質は、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分、または同様の性質の化合物のいずれかを含み得る：結合剤 (例えば、微結晶セルロース、トラガカントゴム、またはゼラチン)；賦形剤 (例えば、デンプンまたはラクトース)、崩壊剤 (例えば、アルギン酸、Primogel、またはトウモロコシデンプン)；滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes)；滑動剤 (glidant) (例えば、コロイド二酸化珪素)；甘味剤 (例えば、スクロースまたはサッカリン)；あるいは香料剤 (例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香料)。吸入による投与については、これらの化合物は、適切な噴霧剤 (例えば、二酸化炭素のようなガスまたはネブライザ) を含む加圧した容器またはディスペンサーからエアロゾルスプレの形態で送達される。

10

**【0118】**

全身投与はまた、経粘膜手段または経皮手段によってであり得る。経粘膜投与または経皮投与については、浸透されるべき障壁に適切な浸透剤 (penetrant) が、この処方物中にて使用され得る。このような浸透剤は、一般に、当該分野において公知であり、そして例えば、経粘膜投与、界面活性剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与については、これらの活性化合物は、当該分野において一般に公知である、軟膏剤 (ointment)、軟膏 (salve)、ゲル剤、またはクリーム剤に処方される。

20

**【0119】**

これらの化合物はまた、直腸送達のために、坐剤の形態 (例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤とともに) または貯留注腸の形態で調製され得る。

**【0120】**

1つの実施形態において、これらの活性化合物は、身体からの化合物の迅速な除去に対してこの化合物を保護するキャリアとともに調製される (例えば、制御放出処方物 (移植片およびマイクロカプセル化送達系を含む))。生分解性の生体適合性ポリマー (例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸) が使用され得る。このような処方物の調製の方法は、当業者に明らかである。この物質はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販され得る。リポソーム懸濁液 (ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞に標的化されたりポソームを含む) もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、当業者に公知の方法 (例えば、米国特許第4,522,811号に記載される) に従って調製され得る。

30

**【0121】**

投与の容易さおよび投薬の均一性のために、投薬単位形態で経口組成物または非経口組成物を処方することは、特に有利である。本明細書中で使用される場合、投薬単位形態は、処置される被検体に対して単回投薬として適切な物理的に分離した単位をいう；各々の単位は、必要とされる薬学的キャリアと一緒に所望の治療効果を生じるように算定された所定量の活性化合物を含む。疾患の型および重篤度に依存して、約  $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$  (例えば、 $0.1 \sim 20 \text{mg} / \text{kg}$ ) の抗体が、例えば、1つ以上の別個の投与であろうと、連続した注入であろうと、患者への投与のための開始候補投薬量である。代表的な一日投薬量は、約  $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$  以上の範囲であり得、これは上記の要因に依存する。数日またはより長い期間にわたる繰り返し投与のために、状態に依存して、処置は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。しかし、他の投薬レジメンが有用であり得る。この治療の進行は、慣用的な技術およびアッセイによって容易にモ

40

50

ニタリングされる。例示的な投薬レジメンは、W O 9 4 / 0 4 1 8 8 に開示される。本発明の投薬単位形態についての詳細は、活性化合物の独特な特徴および達成される特定の治療効果、ならびに個体の処置のためのこのような活性化合物を混合する当該分野に固有の制限によって示され、そして直接的に依存する。

【0122】

本発明の核酸分子は、ベクター中に挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号）によってか、または定位注射（例えば、Chenら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054~3057）によって被検体に送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれている緩徐な放出マトリクスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞（レトロウイルスベクター）からインタクトで産生され得る場合、この薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

10

【0123】

薬学的組成物は、容器、パック、またはディスペンサー内に、投与のための使用説明書と一緒に含まれ得る。

【0124】

(VI. 本発明の使用および方法)

本明細書中に記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体は、1以上の以下の方法で使用され得る：a)スクリーニングアッセイ；b)検出アッセイ（例えば、染色体マッピング、組織タイピング、法医学標本）；c)予測的な医薬品（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、臨床試験のモニタリング、および薬理遺伝学）；ならびにd)処置方法（例えば、治療および予防）。HKID-1タンパク質は、他の細胞タンパク質と相互作用し、従って、HKID-1タンパク質を発現する細胞またはHKID-1経路に関与する細胞（例えば、神経系の細胞）において、HKID-1タンパク質を調節するための治療的分子を開発するための標的として使用され得る。本発明の単離された核酸分子は、HKID-1タンパク質を（例えば、遺伝子治療適用における宿主細胞中での組換え発現ベクターを通じて）発現するため、（例えば、生物学的サンプル中の）HKID-1 mRNAまたはHKID-1遺伝子における遺伝的損傷を検出するために、ならびにHKID-1活性を調節するために使用され得る。さらに、HKID-1タンパク質は、HKID-1活性または発現を調節するために薬物または化合物をスクリーニングするため、ならびにHKID-1タンパク質の不十分または過剰な産生、あるいはHKID-1野生型タンパク質と比較して減少したかまたは異常な活性を有するHKID-1タンパク質形態の産生によって特徴付けられる障害を処置する使用され得る。さらに、本発明の抗HKID-1抗体は、HKID-1タンパク質を検出かつ単離するために、かつHKID-1活性を調節するために使用され得る。

20

30

【0125】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのその使用に提供する。

40

【0126】

(A. スクリーニングアッセイ)

本発明は、HKID-1タンパク質に結合するか、または例えば、HKID-1発現もしくはHKID-1活性に対する刺激効果もしくは阻害効果を有するモジュレーター、すなわち候補または試験化合物または因子（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中で「スクリーニングアッセイ」ともいわれる）を提供する。

【0127】

1つの実施形態において、本発明は、HKID-1タンパク質またはそのポリペプチドもしくは生物学的に活性な部分に結合するか、あるいはその活性を調節する候補化合物また

50

は試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー方法（生物学的ライブラリー；空間的に接近可能な対応する固相または溶液相ライブラリー；デコンボリューション（*deconvolution*）を必要とする合成ライブラリー法；「1ピース1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー方法を含む）における任意の多くのアプローチを使用して得られ得る。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定され、一方、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である（*Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145*）。

【0128】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば、以下において、当該分野で見出され得る：*DeWittら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909*；*Erbら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422*；*Zuckermannら (1994)*、*J. Med. Chem. 37: 2678*；*Chorら (1993) Science 261: 1303*；*Carrellら (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059*；*Carrellら (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061*；および *Gallopら (1994) J. Med. Chem. 37: 1233*。

【0129】

化合物のライブラリーは、溶液中に存在し得るか（例えば、*Houghten (1992) Bio/Techniques 13: 412~421*）、ビーズ上（*Lam (1991) Nature 354: 82~84*）、チップ上（*Fodor (1993) Nature 364: 555~556*）、細菌上（米国特許第5,223,409号）、芽胞上（特許第5,571,698号；同第5,403,484号；および同第5,223,409号）、プラスミド上（*Cullら (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865~1869*）またはファージ上（*ScottおよびSmith (1990) Science 249: 386~390*；*Devlin (1990) Science 249: 404~406*；*Cwirllaら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6387~6382*；ならびに *Felici (1991) J. Mol. Biol. 222: 301~310*）であり得る。

【0130】

1つの実施形態では、本発明のアッセイは、無細胞ベースのアッセイであり、ここでHKID-1タンパク質またはその生物学的に活性な部分と、試験化合物とを接触させる工程、およびHKID-1タンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する試験化合物の能力を決定する工程を包含する。HKID-1タンパク質への試験化合物の結合は、本明細書中に記載されるように、直接的にかまたは間接的にかのいずれかによって決定され得る。1つの実施形態では、このアッセイは、HKID-1タンパク質またはその生物学的に活性な部分と、HKID-1を結合する既知の化合物とを接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、およびこの試験化合物がHKID-1タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここでこの試験化合物がHKID-1タンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、既知の化合物と比較した場合、試験化合物がHKID-1またはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する。

【0131】

別の実施形態において、アッセイは、以下を含む無細胞アッセイである：*HKID-1*タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触する工程、およびHKID-1またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激するまたは阻害する）試験化合物の能力を決定する工程。*HKID-1*の活性を調節する試験化合物の能力を決定する工程は、例えば、直接的な結合を決定するために上述の方法の1つによって、*HKID-1*標的分子に結合するHKID-1タンパク質の能力を決定することによって

10

20

30

40

50

達成され得る。代替の実施形態において、HKID-1の活性を調節する試験化合物の能力を決定する工程は、HKID-1標的分子をさらに調節するHKID-1タンパク質の能力を決定する工程によって達成され得る。例えば、適切な基質に対する標的分子の触媒的/酵素的活性は、先に記載されたように決定され得る。

#### 【0132】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、HKID-1タンパク質またはその生物学的に活性な部分を、HKID-1に結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物がHKID-1タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、試験化合物がHKID-1タンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、HKID-1タンパク質が、HKID-1標的分子に優先的に結合するか、またはHKID-1標的分子の活性を調製する能力を決定する工程を包含する。

10

#### 【0133】

リン酸化基質のホスホアミノ酸分析はまた、HKID-1基質上のどの残基がリン酸化されるかを決定するために、実施され得る。簡単に述べると、放射リン酸化タンパク質バンドは、SDSゲルから切り出され得、そして部分的な酸加水分解に供され得る。次いで、この生成物は、1次元電気泳動によって分離され得、そして例えば、ホスホイメージャー(phosphoimager)において分析され得、そしてニンヒドリン染色ホスホアミノ酸標準と比較される。

#### 【0134】

本発明のなお別の実施形態において、無細胞アッセイは、例えば、インビトロキナーゼアッセイによって、HKID-1タンパク質が、HKID-1標的分子をリン酸化する能力を決定する。簡単に述べると、HKID-1標的分子(例えば、このような分子を発現する細胞株由来の免疫沈降したHKID-1標的分子)を、 $MgCl_2$  および  $MnCl_2$  (例えば、 $10\text{ mM } MgCl_2$  および  $5\text{ mM } MnCl_2$ ) を含む緩衝液中で、HKID-1タンパク質および放射活性ATP(例えば、 $[ \text{-}^3\text{ }^2\text{ P} ] \text{ ATP}$ ) とともにインキュベートし得る。インキュベーションに続いて、免疫沈降したHKID-1標的分子は、還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離され得、膜(例えば、PVDf膜)に移され、そしてオートラジオグラフされ得る。オートラジオグラフ上の検出可能なバンドの出現は、HKID-1基質がリン酸化されたことを示す。

20

30

#### 【0135】

1つの実施形態では、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、ここでHKID-1タンパク質の可溶性形態、またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞は、試験化合物と接触され、そしてHKID-1タンパク質に結合する試験化合物の能力が決定される。例えば、細胞は、酵母細胞または哺乳動物起源の細胞であり得る。試験化合物がHKID-1タンパク質に結合する能力の決定は、例えば、試験化合物を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせ、その結果、HKID-1タンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する試験化合物の結合が、複合体における標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 $^{125}\text{ I}$ 、 $^{35}\text{ S}$ 、 $^1\text{ }^4\text{ C}$ 、または $^3\text{ H}$ で、直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてこの放射性同位体が、放射線放射の直接的な計数によってか、またはシンチレーション計数によって検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素標識は、適切な基質の産物への転換を決定することによって検出され得る。1つの実施形態では、このアッセイは、HKID-1タンパク質の可溶性形態、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞と、HKID-1を結合する既知の化合物とを接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、およびこの試験化合物がHKID-1タンパク質と相互作用する能力を決定する工程であって、ここでこの試験化合物がHKID-1タンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、既知の化合物と比較した場合、試験化合物がHKID-1またはその生物学的に活

40

50

性な部分に優先的に結合する能力を決定する工程を包含する、工程を包含する。

【0136】

別の実施形態では、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、HKID-1タンパク質の可溶性形態、またはその生物学的に活性な部分を発現している細胞と、試験化合物とを接触させる工程、ならびにこの試験化合物がHKID-1タンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する（例えば、刺激するかまたは阻害する）能力を決定する工程を包含する。試験化合物がHKID-1またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力を決定する工程は、例えば、HKID-1タンパク質がHKID-1標的分子に結合するかまたはそれと相互作用する能力を決定することによって達成され得る。本明細書中で使用され得る場合、「標的分子」は、HKID-1タンパク質が天然で結合するかまたは相互作用する分子（例えば、HKID-1タンパク質を発現する細胞の内部においてHKID-1タンパク質によってリン酸化される基質分子、細胞膜の内部表面に会合している分子または細胞質分子）である。HKID-1標的分子は、非HKID-1分子、または本発明のHKID-1タンパク質もしくはポリペプチドであり得る。1つの実施形態では、HKID-1標的分子は、シグナル伝達を媒介するシグナル伝達経路の構成要素である。

10

【0137】

HKID-1タンパク質がHKID-1標的分子に結合するかまたはそれと相互作用する能力を決定する工程は、直接的な結合を決定するための、上記の方法のうちの1つによって達成され得る。1つの実施形態では、このHKID-1タンパク質がHKID-1標的分子に結合するかまたはそれと相互作用する能力を決定する工程は、この標的分子の活性を決定することによって達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、この標的の細胞セカンドメッセンジャー（例えば、細胞内Ca<sup>2+</sup>、ジアシルグリセロール、IP3など）の誘導を検出すること、適切な基質に対するこの標的の触媒/酵素活性を検出すること、レセプター遺伝子（例えば、検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結されたHKID-1応答性調節エレメント）の誘導を検出すること、あるいは細胞応答（例えば、細胞分化、または細胞増殖）を検出することによって決定され得る。

20

【0138】

本発明のアッセイ方法の種々の実施形態において、HKID-1またはその標的分子のいずれかを固定し、このタンパク質の1つまたは両方の複合体化されていない形態からの複合体化された形態の分離を促進すること、およびアッセイの自動化に適応することが所望され得る。候補化合物の存在下および非存在下でのHKID-1に対する標的化合物の結合、またはHKID-1と標的分子との相互作用は、反応物質を含むために適切な任意の容器において達成され得る。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管および微量遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、このタンパク質の1つまたは両方をマトリックスに結合させるドメインを付加する融合タンパク質が提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/HKID-1融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical; St. Louis, MO）またはグルタチオン誘導化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次にこれらは、試験化合物または試験化合物および非吸着標的タンパク質またはHKID-1タンパク質のいずれかと組み合わされ、そしてこの混合物は、複合体形成を誘導する条件下で（例えば、塩およびpHについての生理学的条件下で）インキュベートされる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルは任意の非結合成分を除去するために洗浄され、そして複合体形成は、例えば、上記のように直接または間接的にのいずれかで測定される。あるいは、その複合体は、マトリックスから解離され得、そしてHKID-1結合または活性のレベルは、標準的技術を用いて決定される。

30

40

【0139】

マトリックス上にタンパク質を固定するための他の技術はまた、本発明のスクリーニング

50

アッセイにおいて用いられ得る。例えば、HKID-1またはその標的分子のいずれかは、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化を利用して固定され得る。ビオチン化HKID-1または標的分子は、当該分野で周知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals; Rockford, IL）を用いてビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製され得、そしてストレプトアビジン被膜96-ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルにおいて固定され得る。あるいは、HKID-1または標的分子と反応性だが、HKID-1タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体は、プレートのウェル、および抗体結合体化によりこのウェル中に閉じ込められた非結合の標的またはHKID-1に誘導体化され得る。このような複合体を検出するための方法は、GST-固定複合体について上記された方法に加えて、HKID-1または標的分子と反応性の抗体を用いる複合体の免疫検出、ならびにHKID-1または標的分子に関連する酵素活性を検出することに依存する酵素結合アッセイを含む。

#### 【0140】

別の実施形態において、HKID-1発現の調節因子は、細胞が候補化合物と接触される方法において同定され、そして細胞中のHKID-1のmRNAまたはタンパク質の発現が決定される。候補化合物の存在下におけるHKID-1のmRNAまたはタンパク質の発現レベルが、候補化合物の非存在下におけるHKID-1のmRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較される。次いで、この候補化合物は、この比較に基づき、HKID-1発現の調節因子として同定され得る。例えば、候補化合物の存在下におけるHKID-1のmRNAまたはタンパク質の発現が非存在下におけるその発現よりも大きい（統計学的に有意に大きい）場合、この候補化合物は、HKID-1のmRNAまたはタンパク質の発現の刺激因子として同定される。あるいは、候補化合物の存在下におけるHKID-1のmRNAまたはタンパク質の発現が非存在下におけるその発現よりも少ない（統計学的に有意に少ない）場合、この候補化合物は、HKID-1のmRNAまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞におけるHKID-1のmRNAまたはタンパク質発現のレベルは、HKID-1のmRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書において記載された方法により決定され得る。

#### 【0141】

本発明のなお別の局面において、HKID-1タンパク質は、HKID-1に結合するかまたは相互作用し（「HKID-1結合タンパク質」または「HKID-1-bp」）そしてHKID-1活性を調節する他のタンパク質を同定するため、2ハイブリッドアッセイまたは3ハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」として用いられ得る（例えば、米国特許番号第5,283,317号；Zerovosら（1993）Cell 72:223~232；Maduraら（1993）J. Biol. Chem. 268:12046~12054；Bartelら（1993）Bio/Techniques 14:920~924；Iwabuchiら（1993）Oncogene 8:1693~1696；およびPCT公開番号WO94/10300を参照のこと）。このようなHKID-1結合タンパク質はまた、HKID-1タンパク質によるシグナルの伝達（例えば、HKID-1経路の上流エレメントまたは下流エレメント）に関与するようである。本発明はまた、2ハイブリッドスクリーニングにおけるベイトとしてのHKID-1と相互作用するタンパク質（例えば、HKID-1との2ハイブリッドインタラクター）の使用およびHKID-1相互作用タンパク質相互作用タンパク質の同定を提供する。HKID-1相互作用タンパク質相互作用タンパク質は、HKID-1シグナル伝達経路に関与するようである。

#### 【0142】

本発明は、本明細書に記載される処置について上記のスクリーニングアッセイおよびその使用により同定される新規の因子にさらに提供する。

#### 【0143】

（B. 検出アッセイ）

本明細書において同定されたcDNA配列(および対応する完全遺伝子配列)の部分またはフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で用いられ得る。例えば、これらの配列は以下のために用いられ得る:(i)染色体上のそれぞれの遺伝子をマッピングし、それにより遺伝病に関連する遺伝子領域の位置付けをするため;(ii)わずかな生物学的サンプルから個体を同定する(組織タイピング)ため;および(iii)生物学的サンプルの法医学的な同定を補助するため。これらの適用は以下の小節において記載される。

#### 【0144】

##### (1. 組織タイピング)

本発明のHKID-1配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を同定するために用いられ得る。例えば、合衆国軍は、その職員の同定のために制限フラグメント長多型性(RFLP)の使用を検討している。この技術では、個体のゲノムDNAが1つ以上の制限酵素で消化され、そしてサザンブロット上にプローブされ、同定のための特有のバンドを生じる。この方法であれば、失われ、入れ替えられまたは盗まれ得る、ポジティブな同定を困難にする「ドッグタグ(Dog Tag)」の現在の制限をうけない。本発明の配列はRFLP(米国特許第5,272,057号に記載)のためのさらなるDNAマーカースとして有用である。

10

#### 【0145】

さらに、本発明の配列は、個体のゲノムの選択した部分の実際の塩基ごとのDNA配列を決定する代替技術を提供するために用いられ得る。従って、本明細書において記載されるHKID-1配列は、その配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製するために用いられ得る。次いで、これらのプライマーは、個体のDNAを増幅し、続いてそれを配列決定するために用いられ得る。

20

#### 【0146】

この様式で調製された、個体由来の対応するDNA配列のパネルは、特有の個体の同定を提供し得る。なぜなら、それぞれの個体は対立遺伝子の差異に起因するこのようなDNA配列の特有のセットを有するからである。本発明の配列は、個体由来、および組織由来のこのような同定配列を得るために用いられ得る。本発明のHKID-1配列は、ヒトゲノムの部分を特有に示す。対立遺伝子改変は、これらの配列のコード領域においてある程度まで生じ、そして非コード領域においてより大きい程度まで生じる。個々のヒトの間の対立遺伝子改変は、500塩基あたりおよそ1個の頻度で生じると推定される。本明細書において記載される配列のそれぞれは、同定目的のために比較され得る個体由来のDNAに対して、ある程度まで、標準物として用いられ得る。非コード領域においては、より多数の多型性が生じるので、個体を区別するのに必要な配列はより少なくなる。配列番号1の非コード配列は、100塩基の非コードの増幅された配列をそれぞれ生じる、おそらく10~1,000のプライマーのパネルを用いて、ポジティブ個体同定を十分に提供する。推定コード配列(例えば、配列番号3)が用いられる場合、ポジティブ個体同定のためのプライマーのより適切な数は500~2,000である。

30

#### 【0147】

本明細書において記載されるHKID-1配列からの試薬のパネルが、個体のための特有の同定データベースを生成するために用いられる場合、これらの同じ試薬は、その個体由来の組織を同定するために後で用いられ得る。特有の同定データベースを用いて、個体(生存または死亡している)のポジティブ同定は、非常にわずかな組織サンプルからなされ得る。

40

#### 【0148】

##### (2. 法医生物学における部分HKID-1配列の使用)

DNAに基づく同定技術はまた、法医生物学において用いられ得る。法医生物学は、例えば犯罪の加害者をポジティブに同定するための手段として、犯罪現場で発見された生物学的証拠の遺伝子タイピングを使用する科学分野である。このような同定を行うため、PCR技術が、犯罪現場で発見された、組織(例えば、毛髪または皮膚)または体液(例えば

50

、血液、唾液または精液)のような非常に少量の生物学的サンプルから取り出されたDNA配列を増幅するために用いられ得る。次いで、増幅された配列は、標準物と比較され得、これにより、生物学的サンプルの起源の同定が可能になる。

【0149】

本発明の配列は、ヒトゲノム中の特定の遺伝子座に標的化される、ポリヌクレオチド試薬(例えば、PCRプライマー)を提供するために用いられ得、これは例えば、別の「同定マーカー」(すなわち、特定の個体に特有の別のDNA配列)を提供することにより、DNAに基づく法医同定の信頼性を増強し得る。上記のように、実際の塩基配列情報は、制限酵素が生成したフラグメントにより形成されたパターンに対する正確な代替物として同定のために用いられ得る。配列番号1の非コード領域に対して標的された配列は、この非コード領域でより多数の多型性が生じる場合、この用途のために特に適切である。このことは、この技術を用いて個体を区別することを容易にする。ポリヌクレオチド試薬の例としては、HKID-1配列またはその部分(例えば、少なくとも20または30塩基の長さを有する、配列番号1の非コード領域由来のフラグメント)が挙げられる。

10

【0150】

本明細書において記載されるHKID-1配列は、さらにポリヌクレオチド試薬、例えば、標識プローブまたは標識可能プローブ(これは、例えば、インサイチュハイブリダイゼーション技術において、特定の組織(例えば、脳組織)を同定するために用いられ得る)を提供するために用いられ得る。これは、法医病理学者が不明の起源の組織を提示される場合に非常に有用であり得る。このようなHKID-1プローブのパネルは、種のタイプおよび/または器官の型により組織を同定するために用いられ得る。

20

【0151】

類似の様式で、これらの試薬(例えば、HKID-1のプライマーまたはプローブ)は、混入物について組織培養物をスクリーニング(すなわち、培養中の異なる型の細胞の混合物の存在についてスクリーニング)するために用いられ得る。

【0152】

(C. 予測医学)

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノム学および臨床試験モニタリングが予後(予測的)目的のために用いられる予測医学の分野を提供し、それにより個体を予防的に処置する。従って、本発明の1つの局面は、生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞、組織)の状況で、HKID-1タンパク質および/または核酸の発現ならびにHKID-1活性を決定するための診断アッセイに関し、これにより、個体が、異常なHKID-1発現または活性に関連する疾患または障害に罹患しているか、または障害を発生する危険性があるか否かを決定する。本発明はまた、個体がHKID-1タンパク質、核酸発現または活性に関連する障害を発症する危険性があるか否かを決定するための予後(すなわち予測的)アッセイを提供する。例えば、HKID-1遺伝子における変異は、生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後目的または診断目的のために用いられ得、これによりHKID-1タンパク質、核酸発現または活性により特徴づけられるかまたはこれらに関連する障害の発現の前に個体を予防的に処置する。

30

【0153】

本発明の別の局面は、個体におけるHKID-1タンパク質、核酸発現またはHKID-1活性を決定し、これにより、その個体について適切な治療的薬剤または予防的薬剤を選択するための方法(本明細書において「薬理ゲノム」とよぶ)を提供する。薬理ゲノムは、個体の遺伝子型(例えば、個体が特定の薬剤に反応する能力を決定するために試験された個体の遺伝子型)に基づく個体の治療的処置または予防的処置のための薬剤(例えば、薬物)の選択を可能にする。

40

【0154】

本明細書のなお別の局面は、臨床試験におけるHKID-1の発現または活性に対する、薬剤(例えば、薬物または他の化合物)の影響のモニタリングを提供する。

【0155】

50

これらおよび他の薬剤は、以下の節でさらに詳細に記載される。

【0156】

(1. 診断アッセイ)

生物学的サンプル中におけるHKID-1の存在または非存在を検出するための例示的方法は、試験被験体から生物学的サンプルを入手する工程、およびこの生物学的サンプルを、HKID-1のタンパク質または核酸(例えば、mRNA、ゲノムDNA)(HKID-1タンパク質をコードする)を検出し得る化合物または因子と接触させ、これにより生物学的サンプル中でHKID-1の存在が検出される工程を含む。HKID-1のmRNAまたはゲノムDNAを検出するための因子は、HKID-1のmRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る標識された核酸プローブであり得る。核酸プローブは、例えば、全長HKID-1核酸(例えば、配列番号1または3の核酸)またはその部分(例えば、少なくとも15、30、50、100、250または500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチド、そしてHKID-1のmRNAまたはゲノムDNAにストリンジентな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチド)であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用に適切な他のプローブが、本明細書に記載される。

10

【0157】

HKID-1タンパク質を検出するための因子は、HKID-1タンパク質に結合し得る抗体(好ましくは検出可能標識を有する抗体)であり得る。抗体は、ポリクローナル抗体、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント(例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>)が用いられ得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識された」は、プローブまたは抗体への検出可能な物質の結合(すなわち、物理的連結)によるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに直接標識されている別の試薬との反応によるプローブまたは抗体の間接的標識を含むことが意図される。間接的標識化の例としては、蛍光的に標識した二次抗体を用いる一次抗体の検出、およびビオチンを用いるDNAプローブの末端標識化(これにより、このプローブは蛍光的に標識されたストレプトアビジンで検出され得る)が挙げられる。用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞および生物学的流体、ならびに被験体中に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボにおいて生物学的サンプル中のHKID-1のmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを検出するために用いられ得る。例えば、HKID-1のmRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。HKID-1タンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウエスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光法が挙げられる。HKID-1ゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、HKID-1タンパク質の検出のためのインビボ技術は、標識した抗HKID-1抗体を被験体に導入する工程を含む。例えば、抗体は、被験体における存在および位置が標準的画像化技術により検出され得る放射性マーカーで標識され得る。

20

30

【0158】

1つの実施形態において、生物学的サンプルは、試験被験体からのタンパク質分子を含む。あるいは、この生物学的サンプルは、試験被験体由来のmRNA分子または試験被験体由来のゲノムDNA分子を含み得る。生物学的サンプルは、被験体から従来的手段により単離された末梢血白血球サンプルである。

40

【0159】

別の実施形態において、この方法はさらに、以下の工程を包含する：コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、このコントロールサンプルを、HKID-1のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出し得る化合物または薬剤と接触させ、その結果、HKID-1のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在がこの生物学的サンプルにおいて検出される工程、およびこのコントロールサンプル中のHKID-1のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在を、試験サンプル中のHK

50

I D - 1 のタンパク質、m R N A、またはゲノム D N A の存在と比較する工程。

【 0 1 6 0 】

本発明はまた、生物学的サンプル（試験サンプル）中の H K I D - 1 の存在を検出するためのキットを包含する。このようなキットを使用して、被験体が H K I D - 1 の異常な発現と関連する障害（例えば、免疫学的障害）を罹患しているか、またはこのような障害を発症する危険性が増加しているか否かを検出し得る。例えば、このキットは、生物学的サンプル中の H K I D - 1 のタンパク質または m R N A を検出し得る標識された化合物または薬剤、およびこのサンプル中の H K I D - 1 の量を決定するための手段（例えば、抗 H K I D - 1 抗体、または H K I D - 1 をコードする D N A（例えば、配列番号 1 または配列番号 3）に結合するオリゴヌクレオチドプローブ）を備え得る。キットはまた、試験される被験体が、H K I D - 1 のタンパク質または m R N A の量が正常レベルより高いかまたはそれ未満の場合に、H K I D - 1 の異常な発現と関連する障害に罹患しているか、またはそのような障害を発症する危険性にあるかを観察するための指示書を備え得る。

10

【 0 1 6 1 】

抗体ベースのキットについて、このキットは、例えば、以下を備える：（1）H K I D - 1 タンパク質に結合する第 1 抗体（例えば、固体支持体に付着されている）；および必要に応じて、（2）H K I D - 1 タンパク質または第 1 抗体に結合し、かつ検出可能な薬剤に結合体化されている、第 2 の異なる抗体。

【 0 1 6 2 】

オリゴヌクレオチドベースのキットについて、このキットは、例えば、以下を備え得る：（1）H K I D - 1 核酸配列にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド）、または（2）H K I D - 1 核酸分子を増幅するために有用な一対のプライマー。

20

【 0 1 6 3 】

このキットはまた、例えば、緩衝化剤、保存剤、またはタンパク質安定化剤を備え得る。このキットはまた、検出可能な薬剤を検出するために必要な成分（例えば、酵素または基質）を備え得る。このキットはまた、アッセイされそして含まれる試験サンプルと比較され得るコントロールサンプルまたは一連のコントロールサンプルを備え得る。このキットの各成分は、通常、個別の容器内に包含され、そして様々な容器の全ては、試験される被験体が H K I D - 1 の異常な発現と関連する障害に罹患しているかまたはそのような障害を発症する危険性にあるか否かを観察するための指示書とともに、単一のパッケージ内にある。

30

【 0 1 6 4 】

（ 2 . 予後アッセイ ）

本明細書中に記載される方法はさらに、異常な H K I D - 1 の発現または活性に関連する疾患または障害を有するか、またはそれを発症する危険性のある被験体を同定するための診断アッセイまたは予後アッセイとして利用され得る。例えば、本明細書中に記載されるアッセイ（例えば、前述の診断アッセイまたは以下のアッセイ）は、H K I D - 1 のタンパク質、核酸発現もしくは活性に関連する障害を有するか、またはそれを発症する危険性にある被験体を同定するために利用され得る。あるいは、予後アッセイは、このような疾患または障害を有するか、またはそれを発症する危険性にある被験体を同定するために利用され得る。従って、本発明は、試験サンプルが被験体から得られ、そして H K I D - 1 のタンパク質または核酸（例えば、m R N A , ゲノム D N A）が検出される方法を提供し、ここで H K I D - 1 のタンパク質または核酸の存在は、異常な H K I D - 1 の発現または活性と関連する疾患または障害を有するか、またはそれを発症する危険性にある被験体についての診断である。本明細書中使用される場合、「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られる生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織であり得る。

40

【 0 1 6 5 】

さらに、本明細書中に記載される予後アッセイは、被験体が異常な H K I D - 1 の発現ま

50

たは活性と関連する疾患または障害を処置するために薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補体）を投与され得るか否かを決定するために使用され得る。例えば、このような方法は、被験体が、特定の薬剤または薬剤のクラス（例えば、HKID-1活性を減少する型の薬剤）を用いて効果的に処置され得るか否かを決定するために使用され得る。従って、本発明は、被験体が、異常なHKID-1の発現または活性と関連する障害について、薬剤を用いて効果的に処置され得るか否かを決定するための方法を提供し、ここで、試験サンプルが得られ、そしてHKID-1のタンパク質または核酸が検出される（例えば、ここで、HKID-1のタンパク質または核酸の存在は、異常なHKID-1の発現または活性と関連する障害を処置するために薬剤を投与され得る被験体についての診断である）。 10

#### 【0166】

本発明の方法はまた、HKID-1遺伝子における遺伝子損傷または変異を検出するために使用され得、それにより、損傷した遺伝子を有する被験体が、異常な細胞増殖および/または分化によって特徴付けられる傷害についての危険性にあるか否かを決定する。実施形態において、この方法は、被験体由来の細胞のサンプルにおいて、HKID-1タンパク質をコードする遺伝子の完全性またはHKID-1遺伝子の誤った発現に影響する少なくとも1つの変更によって特徴付けられる遺伝子損傷または変異の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、このような遺伝子損傷または変異は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：1) HKID-1遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；2) HKID-1遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加； 20  
3) HKID-1遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換；4) HKID-1遺伝子の染色体再編成；5) HKID-1遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更；6) ゲノムDNAのメチル化パターンのような、HKID-1遺伝子の異常な修飾；7) HKID-1遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在；8) HKID-1タンパク質の非野生型レベル；9) HKID-1遺伝子の対立遺伝子欠損；および10) HKID-1タンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書中に記載されるように、HKID-1遺伝子における損傷を検出するために使用され得る当該分野で公知の多数のアッセイ技術が存在する。生物学的サンプルは、被験体から従来の手段によって単離された、末梢血白血球サンプルである。

#### 【0167】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと）（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）、あるいはリガーゼ（ligation）連鎖反応（LCR）（例えば、Landegranら（1988）Science 241:1077-1080；およびNakazawaら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364を参照のこと）における、プローブ/プライマーの使用を含む。この後者は、HKID-1遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る（例えば、Abravayaら（1995）Nucleic Acids Res. 23:675-682を参照のこと）。この方法は、患者からサンプル細胞を収集する工程、サンプル細胞から核酸（例えば、ゲノム、mRNAまたは両方）を 40  
単離する工程、核酸サンプルを、（存在する場合）HKID-1遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が起こる条件下で、HKID-1遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーに接触させる工程、および増幅産物の存在または非存在を検出する工程、または増幅産物のサイズを検出しそしてコントロールサンプルと長さを比較する工程を包含し得る。PCRおよび/またはLCRは、本明細書中に記載される変異の検出に用いられる任意の技術との組合せで、予備増幅工程としての使用が所望され得ることが予測される。

#### 【0168】

代替的増幅方法としては、自己持続性配列複製（self sustained sequence replication）（Guatelliら（1990）Proc. N 50

at l . A c a d . S c i . U S A 8 7 : 1 8 7 4 - 1 8 7 8 )、転写増幅系 ( K w o h r ( 1 9 8 9 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 1 1 7 3 - 1 1 7 7 )、Q - B e t a R e p l i c a s e ( L i z a r d i r a ( 1 9 8 8 ) B i o / T e c h n o l o g y 6 : 1 1 9 7 ) または任意の他の核酸増幅方法、それに続く、当業者に周知の技術を使用するその増幅された分子の検出が挙げられる。これらの検出スキームは、核酸分子が、非常に少数で存在する場合に、そのような分子の検出に特に有用である。

**【 0 1 6 9 】**

代替の実施形態において、サンプル細胞由来の H K I D - 1 遺伝子における変異は、制限酵素切断様式の変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロール DNA を単離し、(必要に応じて)増幅し、1種類以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、そしてゲル電気泳動によってフラグメント長サイズが決定され、そして比較される。サンプル DNA とコントロール DNA との間のフラグメント長の違いは、サンプル DNA における変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム (例えば、米国特許第 5, 498, 531 号を参照のこと) の使用を用いて、リボザイム切断部位の発生または喪失によって、特定の変異の存在についてスコアリングし得る。

10

**【 0 1 7 0 】**

他の実施形態において、H K I D - 1 における遺伝子変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸 (例えば、DNA または RNA) を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイ (C r o n i n r a ( 1 9 9 6 ) H u m a n M u t a t i o n 7 : 2 4 4 ~ 2 5 5 ; K o z a l r a ( 1 9 9 6 ) N a t u r e M e d i c i n e 2 : 7 5 3 ~ 7 5 9 ) にハイブリダイズさせることによって同定され得る。例えば、H K I D - 1 における遺伝的変異は、C r o i n r a ( 前出 ) に記載されるように、発光 DNA プローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。簡単にいうと、プローブの第 1 のハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプル中およびコントロール中の長い DNA 鎖を通じて走査し、配列が重複するプローブの直線アレイを作製することによって配列間の塩基変換を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に引き続き、検出される全ての改変体または変異体と相補的な、より小さく、特化したプローブアレイを使用して、特定の変異の特徴付けを可能にする第 2 のハイブリダイゼーションアレイを行う。各変異アレイは、平行プローブセット (一方は、野生型遺伝子に相補的であり、他方は、変異体遺伝子に相補的である) からなる。

20

30

**【 0 1 7 1 】**

なお別の実施形態において、当該分野に公知の任意の種々の配列決定反応を用いて、H K I D - 1 遺伝子を直接的に配列決定し、そしてサンプル H K I D - 1 の配列を対応する野生型 (コントロール) 配列と比較することによって変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、M a x i m および G i l b e r t ( ( 1 9 7 7 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 4 : 5 6 0 ) または S a n g e r ( ( 1 9 7 7 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 4 : 5 4 6 3 ) によって開発された技術に基づく配列決定反応が挙げられる。任意の種々の自動配列決定手順が、質量分析法による配列決定 (例えば、P C T 子会番号 W O 9 4 / 1 6 1 0 1 ; C o h e n r a ( 1 9 9 6 ) A d v . C h r o m a t o g r . 3 6 : 1 2 7 ~ 1 6 2 ; および G r i f f i n r a ( 1 9 9 3 ) A p p l . B i o c h e m . B i o t e c h n o l . 3 8 : 1 4 7 ~ 1 5 9 を参照のこと) を含む、診断のアッセイ ( ( 1 9 9 5 ) B i o / T e c h n o l o g y 1 9 : 4 4 8 ) を行う場合に利用されることがまた、意図される。

40

**【 0 1 7 2 】**

H K I D - 1 遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断剤からの保護を用いて、RNA / RNA または RNA / DNA ヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法 (M y e r s r a ( 1 9 8 5 ) S c i e n c e 2 3 0 : 1 2 4 2 ) が挙げられる。一般に、「ミスマッチ切断」の技術は、組織サンプル由来の潜在的な変異 RNA または変異 DNA と、野生型 H K I D - 1 配列を含む (標識した) RNA または DNA とを

50

ハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖の提供を必要とする。この2本鎖二重鎖を、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するような二重鎖の1本鎖領域を切断する薬剤で処理する。RNA/DNA二重鎖をRNaseで処理することで、ミスマッチ領域が消化され得、DNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼで処理して、ミスマッチ領域が消化され得る。他の実施態様において、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二重鎖のいずれかが、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムとピペリジンとを用いて処理され得る。ミスマッチ領域の消化後、次いで、得られた物質を、変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズによって分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; Saleeb 10  
aら、(1992) Methods Enzymol. 217: 286-295を参照のこと。好ましい実施態様において、コントロールDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

#### 【0173】

なお別の実施態様において、このミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルから得られたHKID-1 cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするための規定されたシステムにおいて、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（いわゆる、「DNAミスマッチ修復」酵素）を使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsuら、(1994) Carc 20  
cinogenesis 15: 1657-1662)。例示的な実施形態に従って、HKID-1配列（例えば、野生型HKID-1配列）に基づくプローブを、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズさせる。この二重鎖をDNAミスマッチ修復酵素で処理し、そして、存在する場合に、この切断産物を電気泳動プロトコルなどから検出し得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

#### 【0174】

他の実施形態において、電気泳動移動度における変化を使用して、HKID-1遺伝子における変異を同定する。例えば、一本鎖配座多型(single-strand conformation polymorphism) (SSCP)を使用して、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動移動度における差異を検出し得る(Oritaら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2766; またCotton 30  
(1993) Mutat. Res. 285: 125-144; Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79を参照のこと)。サンプルおよびコントロールHKID-1核酸の一本鎖DNAフラグメントは、変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変動し、そして電気泳動移動度において生じた変化は、単一の塩基変化さえ検出することが可能にする。DNAフラグメントは、標識され得るか、または標識したプローブを用いて検出され得る。このアッセイの感度は、(DNAよりむしろ)RNAを使用することによって増強され得、ここで、その二次構造が、配列における変化に対してより感受性である。実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動移動度における変化に基づいて二本鎖 40  
ヘテロ二重鎖分子を分離する(Keenら(1991) Trends Genets. 7: 5)。

#### 【0175】

なお別の実施形態において、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型のフラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE) (Myers 50  
ら(1985) Nature 313: 495)を使用してアッセイされる。DGGEが分析方法として使用される場合、DNAは、例えば、PCRによって高融点のGCリッチなDNAの約40pのGCクランプを付加することによって、DNAが完全には変性しないことを確認するように改変される。さらなる実施形態において、温度勾配を、変性勾配の代わりに用いて、コントロールDNAおよびサンプルDNAの移動度における差異を同

定する (Rosenbaum および Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:12753)。

【0176】

点変異を検出するための他の技術の例としては、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中央に配置されて調製され得、次いで完全な一致が見出される場合のみにハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAにハイブリダイズされ得る (Saikiら (1986) Nature 324:163; Saikiら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230)。このような対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが、ハイブリダイズメンブランに付着され、そして標識化標的DNAとハイブリダイズされる場合に、PCR増幅された標的DNA、または多数の異なる変異にハイブリダイズされる。

10

【0177】

あるいは、対立遺伝子特異的増幅技術 (これは、選択的PCR増幅に依存する) は、本発明と共に用いられ得る。特異的増幅のためのプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、分子の中央において目的の変異を保有し得る (その結果、増幅は、示差的ハイブリダイゼーション (Gibbsら、(1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448)、または適切な条件下で、ミスマッチがポリメラーゼ伸長を防止もしくは減少させ得る、1つのプライマーの一番端の3'末端 (Prossner (1993) Tibtech 11:238) に依存する)。さらに、変異の領域に新規の制限部位を導入して、切断に基づく検出を生じることが望ましくあり得る (Gaspariniら (1992) Mol. Cell. Probes 6:1)。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅のためのTaqリガーゼを用いて行われ得ることが予測され得る (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。このような場合において、連結は、5'側配列の3'末端に完全一致が存在する場合にのみ生じ、特定の部位での既知の変異の存在を、増幅の存在または非存在を探ることによって検出可能にする。

20

【0178】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む予めパッケージ化された診断キットを利用することによって、行われ得る。このキットは、例えば、臨床的設定において、HKID-1遺伝子に関する疾患もしくは疾病の症状または家族歴を示す患者を診断するために、都合良く使用され得る。

30

【0179】

さらに、HKID-1が発現される任意の細胞型または組織、好ましくは末梢血白血球は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。

【0180】

(3. 薬理ゲノム学)

本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるような、HKID-1活性 (例えば、HKID-1遺伝子発現) に対する刺激または阻害効果を有する試薬もしくはモジュレーターは、個体に投与されて、異常なHKID-1活性と関連する障害 (例えば、HKID-1が発現される細胞および組織 (例えば、神経系の細胞) を含む障害) を処置 (予防的にまたは治療的に) し得る。このような処置と共に、個体の薬理ゲノム学 (すなわち、個体の遺伝子型と、外来の化合物もしくは薬物に対するその個体の応答との間の関連性の研究) が、考察され得る。治療薬の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関連性を変化させることによって、重篤な毒性または治療的失敗を引き起こし得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考察に基づいて、予防的または治療的な処置のための有効な薬剤 (例えば、薬物) の選択を可能にする。このような薬理ゲノム学をさらに用いて、適切な投薬量および治療レジメンを決定

40

50

し得る。従って、個体における、H K I D - 1 タンパク質の活性、H K I D - 1 核酸の発現、またはH K I D - 1 遺伝子の変異量を決定して、それによって個体の治療的または予防的な処置のための適切な薬剤を選択し得る。

#### 【0181】

薬理ゲノム学は、罹患した人における変化された薬物分布および異常な作用に起因する、薬物に対する応答における臨床的に有意な遺伝的バリエーションを扱う。例えば、L i n d e r ( 1 9 9 7 ) C l i n . C h e m . 4 3 ( 2 ) : 2 5 4 - 2 6 6 を参照のこと。一般に、2つの型の薬理遺伝的状態は区別され得る。身体に対する薬物作用の様式を変化させる単一の因子として伝達される遺伝状態は、「変化された薬物作用」といわれる。薬物に対する身体作用の様式を変化させる単一の因子として伝達される遺伝状態は、「変化された薬物代謝」といわれる。これらの薬理遺伝的状態は、まれな欠損または多型のいずれかとして生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症(G6PD)は、一般的な遺伝酵素病である。この主な臨床的合併症は、酸化薬物(抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消費の後の溶血である。

10

#### 【0182】

例示的な実施形態として、酵素を代謝する薬物の活性は、薬物作用の効力および持続時間の両方の主な決定因子である。薬物代謝酵素(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)、ならびにシトクロムP450酵素のCYP2D6およびCYP2C19)の遺伝的多型の発見は、何人かの患者が、薬物の標準的かつ安全な用量を得た後に、予想される薬物効果を得ないか、または過度の薬物応答および重篤な毒性を示す理由に関しての説明を提供した。これらの多型は、集団における2つの表現型(高代謝群(extended metabolizer)(EM)および低代謝群(PM)(poor metabolizer))で表される。PMの有病率は、種々の集団について異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は、高度な多型であり、そして、いくつかの変異がPMにおいて同定されており、これは、全て機能的CYP2D6の非存在に導く。CYP2D6およびCYP2C19の低代謝群は、それらが、標準的な用量を受ける場合に、過度の薬物応答および副作用を、きわめて頻繁に経験する。代謝産物が、活性な治療用分子である場合、PMは、そのCYP2D6型代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるような、治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しない、いわゆる、超迅速代謝群(ultra-rapid metabolizer)である。最近、超迅速代謝の分子的な基礎は、CYP2D6遺伝子増幅によるものであることが確認された。

20

30

#### 【0183】

従って、個体における、H K I D - 1 タンパク質の活性、H K I D - 1 核酸の発現、H K I D - 1 遺伝子の変異量を決定して、それによって個体の治療的または予防的な処置のための適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理遺伝的研究を用いて、個体の薬物応答性表現型の同定に、薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型決定を適用し得る。この知見により、投薬量または薬物の選択に適用する場合に、有害な反応または治療的失敗を避け得、従って被験体をH K I D - 1 モジュレーター(例えば、本明細書中に記載される例示的スクリーニングアッセイの1つによって同定されるモジュレーター)を用いて処置する場合に、治療的または予防的な効果を増大させ得る。

40

#### (4. 臨床試験の間の効果のモニタリング)

H K I D - 1 の発現または活性に対する薬剤(例えば、薬物、化合物)の影響(例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力)をモニターすることは、基本的薬物スクリーニングにおいてのみならず、臨床試験においても適用され得る。例えば、H K I D - 1 遺伝子発現、タンパク質レベル、またはタンパク質活性を、増大させるための、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定されるような、薬剤の有効性は、低下したH K I D - 1 遺伝子発現、タンパク質レベル、もしくはタンパク質活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセ

50

イによって決定されるような、H K I D - 1 遺伝子発現、タンパク質レベル、またはタンパク質活性を、低下させるための薬剤の有効性は、増加したH K I D - 1 遺伝子発現、タンパク質レベル、もしくはタンパク質活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、H K I D - 1 発現または活性は、そして好ましくは、例えば、細胞増殖障害に關与する他の遺伝子の発現または活性は、特定の細胞の免疫応答性のマーカーとして用いられ得る。

【0184】

例えば、そして限定を意味しないが、H K I D - 1 活性を調節する薬剤（例えば、化合物、薬物、または低分子）での処理によって細胞において調節される遺伝子（H K I D - 1 を含む）が、（例えば、本明細書中に記載されているスクリーニングのアッセイにおいて同定されるように）同定され得る。従って、細胞増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞は、単離され得、そしてRNAが調製され、そしてH K I D - 1 遺伝子、およびこの障害に關与する他の遺伝子の発現のレベルについて分析される。遺伝子発現のレベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載されるように、ノーザンブロット分析もしくはRT - PCRによって定量され得るか、実施例2において記載されるような多重組織発現アレイにハイブリダイズすることによって、または、あるいは、産生されるタンパク質の量を測定することによって、本明細書中に記載されるような方法の1つによって、またはH K I D - 1 遺伝子もしくは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この方法において、遺伝子発現パターンは、薬剤に対する細胞の生理学的応答を示す、マーカーとして役立ち得る。従って、この応答状態は、薬剤での個体の処置の前、およびその間の様々な時点で測定され得る。

【0185】

実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補）での被験体の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する。この方法は、（i）薬剤の投与の前に被験体由来の投与前サンプルを得る工程；（ii）投与前サンプルにおいて、H K I D - 1 タンパク質、mRNA、もしくはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；（iii）被験体由来の1つ以上の投与後サンプルを得る工程；（iv）投与後のサンプルにおいてH K I D - 1 タンパク質、mRNA、もしくはゲノムDNAの発現もしくは活性のレベルを検出する工程；（v）投与後のサンプルにおけるH K I D - 1 タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAと、投与前サンプルにおけるH K I D - 1 タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現もしくは活性のレベルを比較する工程；ならびに（vi）被験体への薬剤の投与を変化させる工程を包含する。例えば、薬剤の増加した投与は、検出されるより高いレベルまで、H K I D - 1 の発現または活性を増加（すなわち、薬剤の有効性を増加）させることが望まれ得る。あるいは、薬剤の低下した投与は、検出されるより低いレベルまで、H K I D - 1 の発現または活性を低下（すなわち、薬剤の有効性を低下）させることが望まれ得る。

【0186】

（D．処置の方法）

本発明は、異常なH K I D - 1 発現または活性と関連する障害の危険性のある、またはその障害を有する被験体を処置する予防的および治療的な方法の両方を提供する。

【0187】

（1．予防法）

1つの局面において、本発明は、H K I D - 1 発現、または少なくとも1つのH K I D - 1 活性を調節する薬剤を被験体に投与することによって、異常なH K I D - 1 発現もしくは活性と関連する疾患または状態を、患者において防止する方法を提供する。異常なH K I D - 1 発現もしくは活性によって、引き起こされるか、または異常なH K I D - 1 発現もしくは活性に寄与する疾患の危険性のある被験体は、例えば、本明細書中に記載される

ような診断または予防のアッセイのいずれか、もしくは組合せによって同定され得る。予防的薬剤の投与は、HKID-1異常性の特徴的な症状の徴候の前に行われ得、その結果、疾患または障害は、その進行において予防され得るか、あるいは遅延され得る。HKID-1異常性の型に依存して、例えば、HKID-1アゴニストまたはHKID-1アンタゴニストは、被験体を処置するために用いられ得る。適切な薬剤は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基づいて、決定され得る。

【0188】

(2. 治療法)

本発明の別の局面は、治療目的のためのHKID-1発現または活性を調節する方法を提供する。本発明の調節方法は、細胞と関連するHKID-1タンパク質活性の1つ以上の活性を調節する薬剤と、細胞とを接触させる工程を包含する。HKID-1タンパク質活性を調節する薬剤は、本明細書中に記載される薬剤(例えば、低分子(例えば、HKID-1のタンパク質キナーゼ活性を調節する低分子)核酸もしくはタンパク質、HKID-1タンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、HKID-1ペプチド模倣物)であり得る。1つの実施形態において、この薬剤は、HKID-1タンパク質の1つ以上の生物学的活性を刺激する。このような刺激性薬剤の例としては、HKID-1の1つ以上の活性(例えば、HKID-1タンパク質キナーゼ活性)を刺激する低分子、活性なHKID-1タンパク質および細胞に導入されたHKID-1タンパク質をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、HKID-1タンパク質の1つ以上の生物学的活性を阻害する。このような阻害性薬剤の例としては、1つ以上のHKID-1活性(例えば、HKID-1タンパク質キナーゼ活性)を阻害する低分子、アンチセンスHKID-1核酸分子および抗HKID-1抗体が挙げられる。これらの調節方法は、(例えば、この薬剤で細胞を培養することによって)インビトロで、あるいは(例えば、被験体にこの薬剤を投与することによって)インビトロで行われ得る。このように、本発明は、HKID-1タンパク質または核酸分子の異常な発現もしくは活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。本発明はまた、HKID-1およびHKID-1タンパク質または核酸分子の活性を調節することによって処置され得る疾患または障害に罹患する個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、本方法は、HKID-1発現または活性を調節する(例えば、アップレギュレートするか、もしくはダウンレギュレートする)薬剤(例えば、低分子(例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される薬剤))、または薬剤の組合せを投与することを包含する。

【0189】

HKID-1活性の刺激は、HKID-1が異常にダウンレギュレートされる状況、および/または増大したHKID-1活性が有益な効果を有するようである状況において望ましい。逆に、HKID-1活性の阻害は、HKID-1活性が異常にアップレギュレートされる状況、および/または低下したHKID-1活性が有益な効果を有するようである状況において望ましい。

【0190】

本発明は、限定として解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに例示される。本出願の全体を通じて引用される全ての参照、特許および公開特許出願の内容は、本明細書で参考として援用される。

【実施例】

【0191】

(実施例1: HKID-1のヌクレオチド配列の決定)

標準的なクローニングベクターにおいて構築されたcDNAライブラリーから単離されたヒトHKID-1 cDNAを配列決定した。cDNA配列を、コンティグへとアセンブリし、HKID-1配列を、このコンティグのコンセンサス配列から決定した。コンティグの分析により、新規の326アミノ酸タンパク質をコードすると予想される978塩基対のオープンリーディングフレームを有する、約2126kbのHKID-1 cDNA

配列が明らかとなった。非翻訳領域を含む約 2126 のヌクレオチド長であるヒト HKID-1 配列 (図 1A ; 配列番号 1) は、予想されたメチオニン開始コード配列 (停止コードを含む約 981 のヌクレオチド (すなわち、配列番号 1 のヌクレオチド 171 ~ 1151 ; 配列番号 3 のヌクレオチド 1 ~ 981)) を含む。コード配列は、326 アミノ酸タンパク質 (配列番号 1) をコードする。

#### 【0192】

(実施例 2 : ヒト組織における HKID-1 mRNA の分布)

HKID-1 mRNA 発現を、ナイロンメンブレン上 (ヒト多重組織発現 (MTE) アレイ、Clontech ; Palo Alto, CA) にアレイされたヒトポリ A + RNA に対して、放射性標識された HKID-1 特異的 DNA プローブをハイブリダイズさせることによって分析した。以下のヒト組織および細胞株由来のポリ A + RNA が、MTE アレイに存在する : 脳の全体、大脳皮質、前頭葉、頭頂葉、後頭葉、側頭葉、大脳皮質の中心傍回、橋、左小脳、右小脳、脳梁、扁桃、尾状核、海馬、延髄、被殻、黒質、側坐核、視床、下垂体、脊髄、心臓、大動脈、左心房、右心房、左心室、右心室、心室中隔、心尖、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸 (ilocecum)、虫垂、上行結腸、横行結腸、下行結腸、直腸、骨格筋、脾臓、胸腺、末梢血白血球、リンパ節、骨髄、気管、肺、胎盤、膀胱、子宮、前立腺、精巣、卵巣、肝臓、膵臓、副腎、甲状腺、唾液腺、乳腺、HL-60 白血球細胞株、S3 HeLa 細胞株、K-562 白血球細胞株、MOLT-4 白血球細胞株、ラージバーキット (Raji Burkitt) リンパ細胞株、ダウジバーキット (Daudi Burkitt) リンパ細胞株、SW480 結腸直腸腺癌、A549 肺癌細胞株、胎児脳、胎児心臓、胎児腎臓、胎児肝臓、胎児脾臓、胎児胸腺、胎児肺。

#### 【0193】

発現分析を行うために、HKID-1 cDNA の一部分を、ハイブリダイゼーションプロローブとしての用途目的で、PCR を用いて合成した。HKID-1 特異的 DNA を、供給業者の指示書に従い、Prime-It キット (Stratagene ; La Jolla, CA) を用いて、32P-dCTP により放射能標識した。MTE アレイフィルターを、ExpressHyb ハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) 中で、放射標識した HKID-1 特異的 DNA プローブによりプローブし、製造業者の推奨に従い、高ストリンジェントに洗浄した。これらの試験は、HKID-1 mRNA は、MTE アレイに含まれる全ての組織において発現されることを明らかにした。次いで、成体組織における高い発現を、胎盤において検出し、次いで、気管、次いで、肺、次いで、末梢血白血球、次いで、心臓の順で検出した。胎児組織において、最も高い発現を、肺において検出し、次いで、心臓、次いで、腎臓、次いで、脾臓の順で検出した。HKID-1 mRNA の低い発現を、分析した全ての組織において検出した。HKID-1 mRNA 発現は、成体黒質および成体下垂体 (これらでは、HKID-1 mRNA レベルは、中程度であった) を除いて、成体および胎児脳の両方において全体で弱いものであった。

#### 【0194】

(実施例 3 : HKID-1 タンパク質の特徴付け)

この実施例において、ヒト HKID-1 タンパク質のアミノ酸配列を、タンパク質に存在する公知のモチーフおよび / またはドメインのアミノ酸配列および公知のタンパク質のポリペプチド配列と比較した。HKID-1 中に存在するポリペプチドドメインおよび / またはポリペプチドモチーフを、HKID-1 と有意に類似のアミノ酸を有するタンパク質であると同定した。さらに、ヒト HKID-1 タンパク質の分子量を予想した。

#### 【0195】

上記のように同定されたヒト HKID-1 ヌクレオチド配列 (図 1 ; 配列番号 1) は、326 アミノ酸タンパク質 (図 1 ; 配列番号 2) をコードする。HKID-1 は、翻訳後改変を含まない約 35.86 kDa と予想される MW を有する。配列番号 2 の HKID-1 ポリペプチド配列を用い、タンパク質パターンの PROSITE データベースに問い合わせ、そして共通タンパク質ドメインおよびファミリーを認識し得る隠れマルコフモデル (H

MM)のライブラリーに問い合わせた。PROSITEデータベースの検索により、配列番号2のアミノ酸260~263から1つのcAMP-依存的タンパク質キナーゼリン酸化部位およびcGMP-依存的タンパク質キナーゼリン酸化部位(PS00004;配列番号4);配列番号5;配列番号2のアミノ酸137~139、275~277、および279~281から3つのタンパク質キナーゼCリン酸化部位(PS00005;配列番号6);配列番号7~9;配列番号2のアミノ酸202~205、211~214、および321~324から3つのカゼインキナーゼIIリン酸化部位(PS00006;配列番号10);配列番号11~13;配列番号2のアミノ酸33~40から1つのチロシンキナーゼリン酸化部位(PS00007;配列番号14);配列番号15;配列番号2のアミノ酸43~48、49~54、57~62、63~68、80~85、98~103、および295~300から7つのN-ミリスチル化部位(PS00008;配列番号16);配列番号17~23;配列番号2のアミノ酸46~54から1つのタンパク質キナーゼATP結合領域特性(PS00107;配列番号24);配列番号25;配列番号2のアミノ酸166~178から1つのセリン/トレオニンタンパク質キナーゼ活性部位特性(PS00108;配列番号26);配列番号27の存在が明らかになった。PFAM分析は、HKID-1が、真核生物タンパク質キナーゼドメインを有することを示す。HMMデータベースの検索により、配列番号2のアミノ酸40~293から1つの真核生物タンパク質キナーゼドメイン;配列番号29の存在が、262.4のスコアおよび $5.9 \times 10^{-7.5}$ のE値(図2を参照のこと)で明らかになった。PFAM識別子に関する一般的な情報について、PS識別記号およびPF識別記号モチーフ同定数は、Sonnhammerら(1997)Protein 28:405~420およびwww.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.htmlを参照のこと。

10

20

30

40

50

#### 【0196】

配列番号2のHKID-1ポリペプチド配列を、BLOSUM62マトリクスおよびタンパク質ワード長3を有するBLASTPプログラムを使用して、タンパク質配列のPROTODデータベースをクエリするために使用した。このBLASTP分析によって同定された、HKID-1に対して最も密接に関連する5つのタンパク質を列挙する:HKID-1は、ラットKID-1(AF086624;配列番号37)に対して1646のスコアで326アミノ酸にわたって95%同一であり、Xenopus laevis(カエル)PIM-1(Q91822;配列番号38)に対して922のスコアで77%同一であり、マウスPIM-1(P06803;配列番号39)に対して873のスコアで類似しており、ラットPIM-1(P26794;配列番号40)に対して884のスコアで類似しており、そしてヒトPIM-1(P11309;配列番号41)に対して883のスコアで類似していることが見出された。

#### 【0197】

図4は、PAM250残基加重表を用いるJ.Hein法を使用してDNASTAR配列分析パッケージのMegAlignプログラムで実施された、配列番号2のHKID-1ポリペプチド配列のアライメントを示し、そしてBLASTP分析によって同定された最も近いHKID-1関係物を5つのみ列挙する。表1は、HKID-1とBLASTP分析によって同定されたその最も近い5つの関係物との間の、ポリペプチド配列類似性パーセントおよびポリペプチド配列分岐パーセントの両方ならびにこのHKID-1関係物と各他のものとの間のポリペプチド配列類似性パーセントおよびポリペプチド配列分岐パーセントを示す。配列対の距離を、PAM250残基加重表を用いるJ.Hein法を使用してDNASTAR配列分析パッケージのMegAlignプログラムで実施した。これらの分析は、HKID-1が、ラットKID-1(Fieldman, J.D.ら、(1998)J.Biol.Chem.273:16535-16543)およびカエルKID-1の種オルソログであることを示す。なぜなら、HKID-1は、PIM-1タンパク質よりもこれら2つのタンパク質により密接に関連するからである。カエルPIM-1およびラットKID-1が、種オルソログであることは報告された(Fieldman, J.

D.ら、(1998) J. Biol. Chem. 273:16535-16543)。HKID-1は、ヒトPIM-1、マウスPIM-1、およびラットPIM-1のパラログである。HKID-1は、その種オルソログ(ラットKID-1およびカエルPIM-1)が、これらが由来する種において果たす、いくつかまたは全ての役割をヒトにおいて果たす。

【0198】

ラットKID-1、カエルPIM-1、ならびにヒトPIM-1およびマウスPIM-1は、インビトロリン酸化アッセイにおいてセリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性を有することが全て公知である。HKID-1とラットKID-1、カエルPIM-1、ならびにヒトPIM-1、HKID-1およびマウスPIM-1、HKID-1との間の高いポリペプチド配列類似性は、HKID-1が、セリン/トレオニンプロテインキナーゼであることを示す。

10

【0199】

ラットKID-1は、Feldman, J. D.ら、(1998). J. Biol. Chem. 273:16535-16543に記載される。ラットKID-1は、カニン酸および電気痙攣ショックに応答して、海馬および皮質の特定の領域において誘導され、このことは、ラットKID-1が、神経機能、シナプス形成性、学習および記憶ならびにカニン酸発作およびいくつかの神経系関連疾患(例えば、発作および癲癇)に関連することを示唆する。HKID-1がラットKID-1の種オルソログであるので、HKID-1は、ラットKID-1が関連するプロセスおよび疾患のいくつかまたは全てに関連する。さらに、HKID-1パラログ(PIM-1タンパク質)は、癌原遺伝子である。従って、HKID-1が、細胞増殖制御、癌、ならびに関連する経路および疾患に関連することは可能である。

20

【0200】

【表1】

表1							
	カエル		ヒト	マウス	ラット	ラット	
	PIM-1	HKID-1	PIM-1	PIM-1	KID-1	PIM-1	
カエル PIM-1	***	77.5	65.5	66.1	77.2	65.5	カエル PIM-1
HKID-1	26.8	***	68.7	68.4	95.4	69.0	HKID-1
ヒト PIM-1	46.0	40.5	***	93.9	68.7	97.1	ヒト PIM-1
マウス PIM-1	44.9	41.0	6.3	***	68.4	94.3	マウス PIM-1
ラット KID-1	27.3	4.7	40.5	41.0	***	68.7	ラット KID-1
ラット PIM-1	46.0	39.9	2.9	6.0	40.5	***	ラット PIM-1

30

(表1)

BLASTP分析において同定されたHKID-1の対距離および最も密接に関連する5つのタンパク質。類似性パーセントを、上向き三角形象限で示し、分岐パーセントを、上向き三角形象限で示す。配列対距離を、PAM250残基加重表を用いるJ. Hein法を使用してDNASTAR配列分析パッケージのMegAlignプログラムで実施した。

40

【0201】

(実施例4: HKID-1融合タンパク質の調製)

組換えHKID-1を、種々の発現系で産生する。1つの実施形態において、成熟HKID-1ペプチドを、E. coli中で組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として発現し、この融合タンパク質を、単離し得、特徴付け得る。HKID-1を、GSTに融合し、この融合タンパク質を、E. coli株PEB199

50

において発現する。GST-HKID-1融合タンパク質のPEB199における発現を、IPTGで誘導する。組換え融合タンパク質を、誘導されたPEB199株の粗細菌溶解物から、グルタチオンビーズでのアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。細菌溶解物から精製したポリペプチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を使用して、得られた融合ポリペプチドの分子量を、決定する。

#### 【0202】

(実施例5:HKID-1の染色体位置の同定)

HKID-1の染色体位置を決定するために、配列番号1のHKID-1ヌクレオチド配列を、BLASTNプログラム(Altschul S.F.ら、(1990)J.Mol.Biol.215:403-410)をワード長12で使用し、そしてBLOSUM62スコア付けマトリクス(ヒトゲノム上にマップされた核酸分子由来のヒトヌクレオチド配列のデータベース)を使用するクエリのために使用した。WI-11798ヌクレオチド配列は、HKID-1配列を含むことが見出され、WI-11798およびHKID-1が同じ染色体位置(第22染色体の結合群の最初から196.70センチレイ(centiRay)の、D22S1169とD22S\_\_qterマーカーとの間の第22染色体)にマップされることが確立された。

#### 【0203】

(実施例6:大スケール組織特異的ライブラリースクリーニングによるHKID-1 mRNAの組織分布)

標準的分子生物学的方法(Sambrook, J., Fritsh, E.F., および Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)を、多くのヒト組織由来の、プラスミドベクター中のcDNAライブラリーを構築するために使用した。各ライブラリーからの個々のcDNAクローンを、単離し、そして配列決定し、これらのヌクレオチド配列を、データベースに入力した。配列番号1のHKID-1ヌクレオチド配列を、BLASTNプログラム(Altschul S.F.ら、(1990)J.Mol.Biol.215:403-410)をワード長12で使用し、BLOSUM62スコア付けマトリクスを使用して、組織特異的ライブラリーcDNAクローンヌクレオチド配列データベースをクエリするために使用した。配列番号1のHKID-1ヌクレオチド配列の部分に同一であるヌクレオチド配列を、ヒトの、皮膚、腎臓、肺、心臓、胸腺、内皮細胞、前立腺、子宮、リンパ節、ニューロン、胎盤、T細胞、胸部および筋肉に由来するcDNAライブラリーに見出した。この結果は、HKID-1 mRNA、またはこれらのフラグメントが、列挙される組織に発現されることを示すが、この組織におけるHKID-1 mRNAの発現レベルについてのなんらかの結論を引き出すことは可能ではない。さらに、HKID-1同一配列が、他の組織由来のライブラリーにおいて検出されなかったという事実は、HKID-1 mRNAが、これらの組織において発現されないということの意味しない。HKID-1核酸配列、このフラグメント、これらの配列によってコードされるタンパク質、およびこのフラグメントならびにHKID-1遺伝子またはタンパク質活性のモジュレーターは、HKID-1 mRNAが発現される組織に関連する疾患を診断または処置するために有用であり得る。

#### 【0204】

(実施例7:HKID-1 mRNAの組織分布)

HKID-1(すなわち、「2190」または「MID2190」)を、いくつかの転写プロファイリング(TxP)実験によって同定した。正常なヒト卵巣上皮細胞(NOE)が数人の患者由来の臨床的腹水サンプルと比較される場合、HKID-1がNOEに比べて腹水サンプルの2/2において、アップレギュレートされることが見出された。この結果を、Taqman(登録商標)ブランド定量的PCRキット、Applied Biosystemsを使用して、続いての定量的PCR実験によって確認した(表2)。定量

的PCR反応を、キットの製造業者の指示書に従って実施した。

【0205】

【表2】

卵巣サンプル中の2190.1発現				
	平均 2190.1	平均 β2	ΔΔ Ct	相対的発現
MDA 127 N 卵巣上皮細胞	22.90	16.38	6.53	10.86
MDA 224 N 卵巣上皮細胞	21.94	16.40	5.54	21.49
MDA 124 卵巣腹水	20.56	15.14	5.43	23.28
MDA 126 卵巣腹水	21.25	16.83	4.42	46.71

10

(表2)

Taqman (登録商標) ブランド定量的PCRキット、Applied Biosystemsを使用した、正常卵巣細胞および卵巣腹水における2190発現。定量的PCR反応を、キットの製造業者の指示書に従って実施した。

【0206】

同様に、形質転換可能細胞株Hs578Tに比べて正常なHs578Bst乳房細胞株を使用する、乳部モデルプロファイリング実験は、Hs578Bstに比べてHs578T株において、HKID-1の高い発現を示した(表3)。軟寒天中で増殖する場合、MCF10A細胞株はまた、プラスチック上で増殖する場合より高いHKID-1の発現を示した(表3)。

20

【0207】

【表3-1】

胸モデルパネルにおける2190.1発現				
組織型	平均 2190.1	β2 平均	ΔΔ Ct	発現
MCF10MS	20.68	19.32	1.36	389.6
MCF10A	19.95	19	0.94	519.4
MCF10AT.cl1	21.29	19.87	1.42	373.7
MCF10AT.cl3	20.91	18.91	2	250.0
MCF10AT1	20.48	19.96	0.52	695.0
MCF10AT3B	21.95	19.36	2.59	166.1
MCF10CA1a.cl1	20.04	16.59	3.45	91.5
MCF10CA1a.cl1 寒天	25.25	24.52	0.73	602.9
MCF10A.m25プラスチック	24.41	24.93	-0.52	1434.0
MCF10CA 寒天	22.91	21.96	0.94	519.4
MCF10CA プラスチック	23.96	21.09	2.88	136.3
MCF3B 寒天	23.35	21.77	1.58	335.6
MCF3B プラスチック	22.06	21.37	0.68	622.0
MCF10A EGF 0 時間	18.16	17.03	1.14	455.3
MCF10A EGF 0.5 時間	17.7	16.81	0.9	535.9
MCF10A EGF 1 時間	17.58	17.04	0.54	685.4
MCF10A EGF 2 時間	17.82	16.62	1.2	436.8

30

40

【0208】

【表3-2】

MCF10A EGF 4 時間	18.93	17.07	1.86	276.4
MCF10A EGF 8 時間	18.89	16.92	1.97	255.3
MCF10A IGF1A 0 時間	22.11	21.56	0.55	685.4
MCF10A IGF1A 0.5 時間	22.55	22.41	0.14	904.4
MCF10A IGF1A 1 時間	22.36	21.83	0.54	690.2
MCF10A IGF1A 3 時間	22.11	21.25	0.87	547.1
MCF10A IGF1A 24時間	21.55	21.14	0.41	755.2
MCF10AT3B.cl5 プラスチック	23.58	21.59	2	250.9
MCF10AT3B.cl6 プラスチック	22.93	21.72	1.22	430.8
MCF10AT3B.cl3 プラスチック	23.06	21.65	1.41	376.3
MCF10AT3B.cl1 プラスチック	23.23	22.11	1.12	460.1
MCF10AT3B.cl4 プラスチック	23.85	21.03	2.82	141.6
MCF10AT3B.cl2 プラスチック	23.13	21.18	1.95	259.7
MCF10AT3B.cl5 寒天	24.02	23.65	0.37	776.5
MCF10AT3B.cl6 寒天	24.11	23.88	0.24	846.7
MCF-7	23.8	23.24	0.56	678.3
ZR--75	22.69	21.75	0.94	519.4
T47D	24.32	21.08	3.24	105.8
MDA-231	23.88	19.44	4.43	46.2
MDA-435	23.51	20.22	3.29	101.9
SkBr3	22.13	20.58	1.54	342.7
Hs578Bst	26.47	20.16	6.3	12.6
Hs578T	22.27	20.02	2.25	211.0

10

20

30

40

50

(表3)

上記、表2に記載されるように、定量的PCRによってモニターされる、種々の胸部組織および細胞株の発現。

【0209】

重要なことに、HKID-1は、血清添加によって、オンコジーンcMycと類似する発現パターンで、HEY卵巣細胞株において誘導されることが示された。HKID-1の発現はまた、HCT116 NOC同期化細胞における時間経過実験において研究された(表4)。

【0210】

【表4】

HCT 116 NOC 同期化細胞における 2190 発現				
	平均 2190	平均 B-2	DCt	相対的発現
HCT 116 NOC t=0	22.04	21.25	0.79	578.34
HCT 116 NOC t=3	21.665	20.825	0.84	558.64
HCT 116 NOC t=6	21.75	20.865	0.885	541.49
HCT 116 NOC t=9	21.645	20.765	0.88	543.37
HCT 116 NOC t=15	22.655	21.935	0.72	607.10
HCT 116 NOC t=18	22.005	21.03	0.975	508.74
HCT 116 NOC t=21	22.085	21.025	1.06	479.63
HCT 116 NOC t=24	22.715	21.38	1.335	396.39

(表4)

Nocodazole (Noc) で同期化された、HCT116 結腸癌細胞の発現。発現を、上記、表2において記載されるように、定量的PCRによってモニターした。

## 【0211】

実験はまた、種々の組織および細胞型におけるHKID-1の発現を決定するために実施された(表4~6を参照のこと)。HKID-1は、卵巣サンプル、胸部サンプル、肺サンプルおよび少しの結腸腫瘍臨床サンプルにおいて高度に発現されることが示された(下記)。

## 【0212】

## 【表5】

腫瘍学期I Iプレートにおける2190.1発現						
組織型	平均	2190.1	$\beta 2$	平均	$\Delta\Delta Ct$	発現
PIT 400 胸部 N	24.34		19.39	4.95		32.46
PIT 372 胸部 N	25.09		20.7	4.39		47.53
CHT 558 胸部 N	26.93		19.59	7.34		6.17
CLN 168 胸部 T: IDC	25.23		20.43	4.8		35.90
MDA 304 胸部 T: MD-IDC	24.55		18.77	5.77		18.33
NDR 57 胸部 T: IDC-PD	24.25		19.09	5.16		28.07
NDR 132 胸部 T: IDC/ILC	24.09		21.27	2.81		142.10
CHT 562 胸部 T: IDC	24.15		19.32	4.82		35.40
NDR 12 胸部 T	25.12		22.2	2.92		132.59
PIT 208 卵巣 N	22.16		19.17	2.98		126.31
CHT 620 卵巣 N	24.86		20.15	4.72		37.94
CLN 03 卵巣 T	27.14		20	7.13		7.14
CLN 17 卵巣 T	24.62		20.34	4.28		51.65
MDA 25 卵巣 T	26.16		22.37	3.79		72.29
MDA 216 卵巣 T	26.59		21.15	5.44		23.04
CLN 012 卵巣 T	26.43		22.41	4.02		61.64
MDA 185 肺 N	25.63		21.11	4.51		43.89
CLN 930 肺 N	24.09		19.16	4.92		32.92
MDA 183 肺 N	22.58		18.14	4.45		45.91
MPI 215 肺 T--SmC	23.03		19.31	3.72		75.89
MDA 259 肺 T-PDNSCCL	23.22		20.45	2.77		147.11
CHT 832 肺 T-PDNSCCL	23.01		19.52	3.5		88.70
CHT 911 肺 T-SCC	22.81		20.07	2.73		150.73
MDA 262 肺 T-SCC	25.34		23.23	2.11		232.45
CHT 211 肺 T-AC	23.62		19.83	3.79		72.29
MDA 253 肺 T-PDNSCCL	23.36		18.41	4.96		32.24
NHBE	24.84		21.59	3.25		105.11
CHT 396 結腸 N	27.1		24.41	2.69		154.96
CHT 523 結腸 N	24.93		19.2	5.72		18.97
CHT 382 結腸 T: MD	22.54		18.27	4.28		51.65
CHT 528 結腸 T: MD	22.57		18.59	3.98		63.15
CLN 609 結腸 T	24.03		19.09	4.94		32.58
CHT 372 結腸 T: MD-PD	24.16		19.63	4.53		43.28
NDR 217 結腸 - Liver Met	24.71		19.18	5.54		21.57
NDR 100 結腸 - Liver Met	22.52		18.29	4.23		53.29
PIT 260 肝臓 N(雌性)	22.97		17.31	5.66		19.85
ONC 102 血管腫	25.22		19.59	5.62		20.33
A24 HMVEC-Arr	22.43		19.55	2.88		136.31
C48 HMVEC-Prol	24.02		21.11	2.9		133.97

10

20

30

40

50

正常な ( N ) および腫瘍の ( T )、組織および細胞を含む、種々の組織および細胞株における、2190 発現。略語一覧：I D C ( 侵襲性腺管癌 )；I L C ( 侵襲性小葉癌 )；S C C ( 扁平上皮細胞癌 )；L i v e r M e t ( 結腸癌肝臓転移 )；H M V E C A r r ( ヒト微小血管内皮細胞停止性 )；H M V E C P r o l ( H M V E C 増殖性 )。発現を、上記、表 2 に記載されるように、定量的 P C R によってモニターした。

【 0 2 1 3 】

【 表 6 - 1 】

β2 を用いた 2190.1 の 1.3.3 相発現				
組織型	平均	β 2 平均	ΔΔ Ct	発現
正常動脈	27.9	21.48	6.42	11.6785
正常静脈	27.77	19.84	7.92	4.129
大動脈 SMC EARLY	27.2	21.02	6.17	13.8401
冠動脈 SMC	26.22	21.75	4.46	45.2794
静的 HUVEC	21.63	20.43	1.2	436.7864
剪断 HUVEC	22.32	20.75	1.58	334.4819
正常心臓	22.55	18.54	4	62.2838
心臓 CHF	22.93	18.77	4.17	55.5527
腎臓	22.98	19.59	3.39	95.3912
骨格筋	24.53	21.54	3	125.434
正常脂肪	24.51	19.73	4.79	36.272
脾臓	24.45	21.15	3.3	101.5315
原発性骨芽細胞	28.15	18.53	9.62	1.2708
破骨細胞 ( 分化した )	23.34	16.93	6.41	11.7597
正常皮膚	24.75	20.77	3.98	63.5925
正常脊髄	26.04	20.17	5.87	17.1577
正常脳皮質	24	20.82	3.19	109.9561
正常脳視床下部	25.45	21.2	4.25	52.556
神経	28.13	24.04	4.09	58.7202
DRG ( 脊髄神経節 )	25.88	21.13	4.75	37.0341
グリア細胞 ( 神経膠星状細胞 )	28.32	22.1	6.22	13.4151
神経膠芽細胞腫	25.23	17.87	7.37	6.0662
正常胸部	24.56	20.13	4.43	46.2309
胸部腫瘍	21.54	17.94	3.6	82.4692
正常卵巣	24.11	19.7	4.41	47.039
卵巣腫瘍	26.75	19.65	7.11	7.2641
正常前立腺	24.34	19.47	4.88	33.9605
前立腺腫瘍	21.18	17.38	3.8	71.7936
上皮細胞 ( 前立腺 )	24.22	21.19	3.03	122.4275
正常結腸	22.98	17.54	5.44	23.0355

10

20

30

40

【 0 2 1 4 】

【 表 6 - 2 】

結腸腫瘍	21.97	18.38	3.59	83.0429
正常肺	22.43	17.77	4.65	39.83
肺腫瘍	21.36	17.95	3.42	93.4281
肺 COPD	22.47	18.13	4.34	49.3776
結腸 IBD	21.64	16.89	4.75	37.1627
正常肝臓	23.04	19.26	3.77	73.0486
肝臓線維症	24.1	20.86	3.24	105.8432
皮膚細胞-線維芽細胞	25.38	19.43	5.95	16.176
正常脾臓	24.41	19.11	5.29	25.471
正常扁桃	21.77	16.68	5.09	29.3601
リンパ節	23.05	17.97	5.08	29.6669
小腸	25.11	19.64	5.47	22.4833
皮膚-褥瘡	24	20	4.01	62.0683
滑膜	25.98	18.65	7.34	6.1936
BM-MNC (骨髄単核細胞)	22.91	16.34	6.57	10.5253
活性化 PBMC	20.67	15.64	5.03	30.6069

(表6)

種々の組織および細胞株における2190の発現。略語一覧：SMC(平滑筋細胞)；CHF(うっ血性心不全)；COPD(慢性閉塞性肺疾患)；IBD(炎症性腸疾患)；PBMC(末梢血単核細胞(休止))。発現を、上記、表2に記載されるように、定量的PCRによってモニターした。

【0215】

【表7】

異種移植片パネルにおける <b>2190.1</b> 発現				
組織型	<b>2190.1</b> 平均	<b>β 2</b> 平均	<b>ΔΔ Ct</b>	発現
MCF-7 胸部 T	22.06	19.61	2.44	183.65
ZR75 胸部 T	23.23	22.11	1.13	458.50
T47D 胸部 T	22.7	19.93	2.77	146.10
MDA 231 胸部 T	22.36	19.52	2.84	140.15
MDA 435 胸部 T	21.48	18.77	2.71	152.30
SKBr3 胸部	22.16	21.14	1.02	491.41
DLD 1 結腸 T (段階 C)	21.96	21.63	0.33	795.54
SW480 結腸 T (段階 B)	25.11	22.76	2.36	195.47
SW620 結腸 T (段階 C)	22.29	20.27	2.02	246.56
HCT116	24.68	23.66	1.02	491.41
HT29	22.13	18.81	3.33	99.79
Colo 205	21.29	17.84	3.45	91.51
NCIH125	24.43	21.23	3.21	108.44
NCIH67	22.79	22.15	0.64	643.94
NCIH322	24.32	22.31	2.01	248.27
NCIH460	24.49	21.35	3.14	113.44
A549	25.45	23.51	1.94	260.62
NHBE	24.66	22.54	2.12	230.05
SKOV-3 卵巣	24.03	19.16	4.87	34.32
OVCAR-3 卵巣	25.09	22.24	2.85	139.18
293 乳児腎臓	23.72	22.66	1.06	477.97
293T 乳児腎臓	24.12	24.18	-0.06	1046.08

10

20

(表7)

種々の組織および細胞株における 2190 発現。発現を、上記、表 2 に記載されるように、定量的 PCR によってモニターした。

【0216】

このデータを、2 / 2 正常卵巣サンプル (低発現)、7 / 7 卵巣腫瘍 (中程度から高発現)、3 / 3 正常肺 (低発現)、4 / 4 肺腫瘍 (中程度の発現)、1 / 1 正常結腸 (低発現) 2 / 2 結腸腫瘍 (高発現)、および 2 / 2 結腸から肝臓転移 (高発現) に HKID - 1 を局在化する ISH によって確認した。発現を、上記、表 2 に記載されるように、定量的 PCR によってモニターした。

【0217】

従って、データは、HKID - 1 が、卵巣細胞モデル系において cMy c と類似して制御されることを示す。さらに、HKID - 1 の過剰発現は、多くのヒト臨床腫瘍サンプルにおいて観察される。従って、MID 2190 (KID - 1) セリン/トレオニンキナーゼの阻害は、My c 依存性様式で腫瘍細胞増殖の低下を補助し得る。

【0218】

(実施例 8 : COS 細胞における組換え HKID - 1 タンパク質の発現)

COS 細胞中で HKID - 1 遺伝子を発現するために、Invitrogen Corporation (San Diego, CA) による pcDNA / Amp ベクターを使用する。このベクターは、SV40 複製起点、アンピシリン耐性遺伝子、E. coli 複製起点、CMV プロモーターおよび続くポリリンカー領域、ならびに SV40 イントロンおよびポリアデニル化部位を含む。全 HKID - 1 タンパク質をコードする DNA フラグメントおよびインフレームでこのフラグメントの 3' 末端に融合された HA タグ (Wilson ら、(1984) Cell 37 : 767) または FLAG タグを、ベクターのポリリンカー領域にクローン化し、それによって CMV プロモーターの制御下に組換えタンパ

30

40

50

ク質の発現を配置する。

【0219】

プラスミドを構築するために、HKID-1 DNA配列を、2つのプライマーを使用してPCRによって増幅する。5'プライマーは、目的の制限部位および続く開始コドンから開始する約20ヌクレオチドのHKID-1コード配列を含み；3'末端配列は、他の目的の制限部位に相補的な配列、翻訳終止コドン、HAタグまたはFLAGタグおよびHKID-1コード配列の最後20ヌクレオチドを含む。PCR増幅フラグメントおよびpCDNA/Ampベクターを、適切な制限酵素で消化し、ベクターを、CIAP酵素(New England Biolabs, Beverly, MA)を使用して脱リン酸化する。好ましくは、選択された2つの制限部位は異なり、その結果、HKID-1遺伝子を正しい方向で挿入する。ライゲーション混合物で、E. coli細胞(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CAから入手可能なHB101株、DH5株、SURE株を使用し得る)を形質転換し、形質転換された培養物を、アンピシリン培地プレート上にプレートし、耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを、形質転換体から単離し、そして正しいフラグメントの存在について制限分析によって試験する。

10

【0220】

その後、COS細胞を、リン酸カルシウム共沈降法または塩化カルシウム共沈降法、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを使用して、HKID-1-pcDNA/AmpプラスミドDNAでトランスフェクトする。宿主細胞をトランスフェクトするための他の適切な方法は、Sambrook, J., Fritsch, E.F.およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989に見出され得る。22348ポリペプチド、23553ポリペプチド、25278ポリペプチド、または26212ポリペプチドの発現を、放射標識(NEN, Boston, MAから入手可能な<sup>35</sup>S-メチオニンまたは<sup>35</sup>S-システインが使用され得る)およびHA特異的モノクローナル抗体を使用する免疫沈降(Harlow, E.およびLane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988)によって検出する。簡潔には、細胞を、<sup>35</sup>S-メチオニン(または<sup>35</sup>S-システイン)で8時間標識する。次いで、培養培地を、回収し、細胞を、界面活性剤(RIPA緩衝液、150mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、0.5% DOC、50mM Tris、pH7.5)を使用して溶解する。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体で沈殿する。次いで、沈殿されたポリペプチドを、SDS-PAGEによって分析する。

20

30

【0221】

あるいは、HKID-1コード配列を含むDNAを、適切な制限部位を使用してpCDNA/Ampベクターのポリリンカーに直接クローン化する。得られたプラスミドを、上記される様式でCOS細胞中にトランスフェクトし、HKID-1ポリペプチドの発現を、放射標識およびHKID-1特異的モノクローナル抗体を使用する免疫沈降によって検出する。

40

【0222】

本発明は、多くの異なる形態で実施され得、そして本明細書中に示される実施形態に限定されると解釈されるべきではなく；むしろ、これらの実施形態は、本発明が、当業者に本発明を十分に知らせるために提供される。本発明の多くの改変および他の実施形態は、本発明が関係する、前述の記載に示される教示の利益を有する当業者に思い浮かぶ。特定の用語が使用されるが、これらは、他に示されない限り当該分野での用語として使用される。

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0223】

【図1a】図1aは、ヒトHKID-1の配列（配列番号1）および推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。配列番号1のオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド171～ヌクレオチド1259（配列番号3）に及ぶ。

【図1b】図1aは、ヒトHKID-1の配列（配列番号1）および推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。配列番号1のオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド171～ヌクレオチド1259（配列番号3）に及ぶ。

【図2】図2は、HKID-1のアミノ酸配列の一部（配列番号29；配列番号2のアミノ酸40～293に対応する）と、隠されたMarkovモデル（PF00069；配列番号28）由来の真核生物プロテインキナーゼドメインコンセンサス配列との整列を示す。整列における上側の配列は、PF00069配列であるが、下側の配列は、配列番号2のアミノ酸40からアミノ酸293である。

【図3】図3は、配列番号2のHKID-1アミノ酸配列のProtean分析を示す。示されているものは、以下である：Garnier-Robsonアルゴリズムを用いて同定された領域、領域、ターン領域およびコイル領域；Chou-Fasmanアルゴリズムを用いて同定された領域、領域およびターン領域；Kyte-Doolittleアルゴリズムを用いて作成された親水性および疎水性プロット；Eisenbergアルゴリズムを用いて同定された両親媒性領域および両親媒性領域；Karpplus-Schulzアルゴリズムを用いて同定された可撓性領域；Jameson-Wolfアルゴリズムを用いて計算された抗原性指数；ならびにEminiアルゴリズムを用いて計算された表面確率プロット。疎水性プロットについては、相対的疎水性が破線の上に示され、相対的親水性が、破線の下に示される。

【図4】図4は、PAM250残基重み表とともにJ.Hein法を用いるDNASTAR配列分析パッケージのMegAlignプログラムによって行われた、配列番号2のHKID-1ポリペプチド配列およびラットKID-1（AF086624；配列番号37）、Xenopus laevis（カエル）PIM-1（Q91822；配列番号38）、マウスPIM-1（P06803；配列番号39）、ラットPIM-1（P26794；配列番号40）、およびヒトPIM-1（P11309；配列番号41）のポリペプチド配列整列を示す。

10

20

30



【 図 4 】

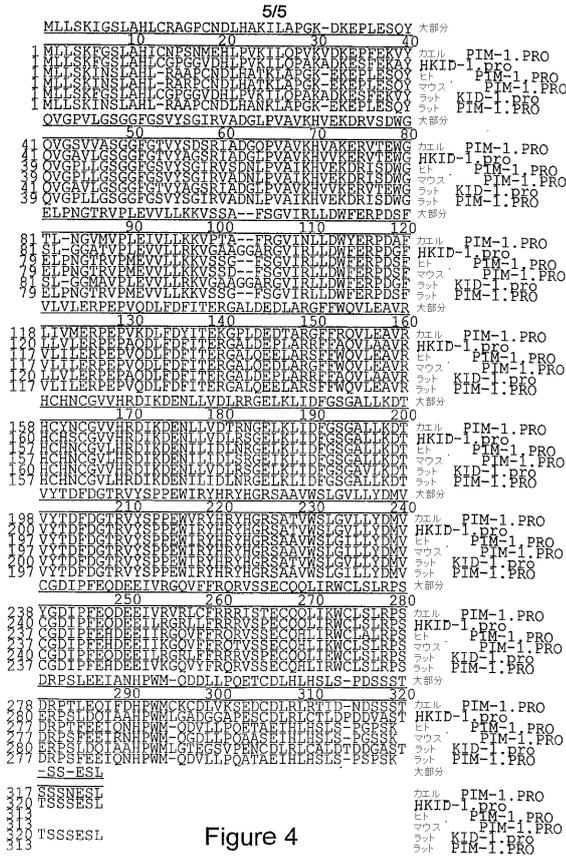


Figure 4

【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 10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number WO 03/029434 A2

(51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US02/31948
(22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 09/971,791 4 October 2001 (04.10.2001) US
(71) Applicant: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS INC.
(72) Inventors: KAPPELLER-LIBERMANN, Rosana
(74) Agents: KRON, Eric, J. et al.

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL MOLECULES OF THE HKID-1 RELATED PROTEIN FAMILY AND USES THEREOF



WO 03/029434 A2

Majority
MALSRLKSTALHFRPQFZNDKSLAAGC-DSKFLGGV
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

(57) Abstract: Novel HKID-1 polypeptides, proteins, and nucleic acid molecules are disclosed. In addition to isolated, full-length HKID-1 proteins, the invention further provides isolated HKID-1 fusion proteins, antigenic peptides and anti-HKID-1 antibodies. The invention also provides HKID-1 nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing a nucleic acid molecule of the invention, host cells into which the expression vectors have been introduced and non-human transgenic animals in which an HKID-1 gene has been introduced or disrupted. Diagnostic, screening and therapeutic methods utilizing compositions of the invention are also provided.

---

**WO 03/029434 A2**

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, 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*

WO 03/029434

PCT/US02/31948

NOVEL MOLECULES OF THE HKID-1-RELATED PROTEIN  
FAMILY AND USES THEREOF

## BACKGROUND OF THE INVENTION

Protein kinases play critical roles in the regulation of biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division (D'Urso, G. et al. (1990) *Science* 250: 786-791; Birchmeier, C. et al. (1993) *Bioessays* 15: 185-189).

5 They serve as growth factor receptors and signal transducers and have been implicated in cellular transformation and malignancy (Hunter, T. et al. (1992) *Cell* 70: 375-387; Posada, J. et al. (1992) *Mol. Biol. Cell* 3: 583-592; Hunter, T. et al. (1994) *Cell* 79: 573-582). For example, protein kinases have been shown to participate in the transmission of signals from growth-factor receptors (Sturgill, T. W. et al. (1988)

10 *Nature* 344: 715-718; Gomez, N. et al. (1991) *Nature* 353: 170-173), control of entry of cells into mitosis (Nurse, P. (1990) *Nature* 344: 503-508; Maller, J. L. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 269-275) and regulation of actin bundling (Husain-Chishti, A. et al. (1988) *Nature* 334: 718-721). Protein kinases can be divided into two main groups based on either amino acid sequence similarity or specificity for either

15 serine/threonine or tyrosine residues. A small number of dual-specificity kinases are structurally like the serine/threonine-specific group. Within the broad classification, kinases can be further sub-divided into families whose members share a higher degree of catalytic domain amino acid sequence identity and also have similar biochemical properties. Most protein kinase family members also share structural features outside

20 the kinase domain that reflect their particular cellular roles. These include regulatory domains that control kinase activity or interaction with other proteins (Hanks, S.K. et al. (1988) *Science* 241: 42-52).

Rat KID-1 is a serine/threonine protein kinase that is induced by membrane depolarization or forskolin but not by neurotrophins or growth factors (Feldman, J.D. et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273:16535-16543). Rat KID-1 is an immediate early gene and is induced in specific regions of the hippocampus and cortex in response to kainic acid and electroconvulsive shock, suggesting that rat KID-1 is involved in neuronal

WO 03/029434

PCT/US02/31948

function, synaptic plasticity, learning, and memory as well as kainic acid seizures and some nervous system-related diseases such as seizures and epilepsy. Rat KID-1 paralogs include the PIM-1 proteins known to be proto-oncogenes. Pim-1 is involved in the transduction of cytokine-mediated mitogenic signals. In addition, there is a strong synergistic oncogenesis between Pim-1 and cMyc, as well as link to apoptosis induction (Mochizuki, T, et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18659-18666). The cell cycle phosphatase Cdc25A, a direct transcriptional target for cMyc, has also been found to be a substrate for Pim-1 kinase. The present invention is based, at least in part, on the discovery of the human species ortholog of rat KID-1, termed HKID-1.

10

## SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based, at least in part, on the discovery of a gene encoding HKID-1, an intracellular protein that is predicted to be a member of the serine/threonine protein kinase superfamily. Based on this, the present invention provides isolated HKID-1 proteins and nucleic acid molecules encoding HKID-1 proteins. The present invention also provides methods of detecting HKID-1 protein or HKID-1 nucleic acids and methods for identifying modulators of HKID-1 protein or HKID-1 nucleic acids.

20

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts the sequence (SEQ ID NO:1) and predicted amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of human HKID-1. The open reading frame of SEQ ID NO:1 extends from nucleotide 171 to nucleotide 1259 (SEQ ID NO:3).

Figure 2 depicts an alignment of a portion of the amino acid sequence of HKID-1 (SEQ ID NO:29; corresponds to amino acids 40 to 293 of SEQ ID NO:2) and a eukaryotic protein kinase domain consensus sequence derived from a hidden Markov model (PF00069; SEQ ID NO:28). The upper sequence in the alignment is the PF00069 sequence while the lower sequence is amino acid 40 to amino acid 293 of SEQ ID NO:2.

Figure 3 shows a Protean analysis of the HKID-1 amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Shown are: alpha, beta, turn and coil regions identified with the Garnier-

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Robson algorithm; alpha, beta and turn regions identified with the Chou-Fasman algorithm; hydrophilicity and hydrophobicity plots generated with the Kyte-Doolittle algorithm; alpha amphipathic and beta amphipathic regions identified with the Eisenberg algorithm; flexible regions identified with the Karplus-Schulz algorithm; 5 the antigenic index calculated using the Jameson-Wolf algorithm; and a surface probability plot calculated using the Emini algorithm. For the hydrophobicity plot, relative hydrophobicity is shown above the dotted line, and relative hydrophilicity is shown below the dotted line.

Figure 4 shows a polypeptide sequence alignment, carried out with the 10 MegAlign program of the DNASTAR sequence analysis package using the J. Hein method with a PAM250 residue weight table, of the HKID-1 polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and rat KID-1 (AF086624; SEQ ID NO:37), *Xenopus laevis* (frog) PIM-1 (Q91822; SEQ ID NO:38), murine PIM-1 (P06803; SEQ ID NO:39), rat PIM-1 (P26794; SEQ ID NO:40), and human PIM-1 (P11309; SEQ ID NO:41).

15

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is based on the discovery of a cDNA molecule encoding human HKID-1, a member of the serine/threonine kinase superfamily. A nucleotide sequence encoding a human HKID-1 protein is shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1; 20 SEQ ID NO:3 includes the open reading frame only). A predicted amino acid sequence of HKID-1 protein is also shown in Figure 1 (SEQ ID NO:2).

The HKID-1 protein of SEQ ID NO:2 is predicted to possess the following sites or domains: one cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (PS00004; SEQ ID NO:4) from amino acids 260-263 of SEQ ID NO:2; SEQ ID 25 NO:5; three protein kinase C phosphorylation sites (PS00005; SEQ ID NO:6) from amino acids 137-139, 275-277, and 279-281, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:7-9; three casein kinase II phosphorylation sites (PS00006; SEQ ID NO:10) from amino acids 202-205, 211-214, and 321-324, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:11-13; one tyrosine kinase phosphorylation site (PS00007; SEQ ID NO:14) from amino acid 33- 30 40, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:15; seven N-myristoylation sites (PS00008; SEQ ID NO:16) from amino acids 43-48, 49-54, 57-62, 63-68, 80-85, 98-103, and 295-300.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:17-23; one protein kinase ATP-binding region signature (PS00107; SEQ ID NO:24) from amino acid 46-54, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:25; one serine/threonine protein kinase active site signature (PS00108; SEQ ID NO:26) from amino acid 166-178, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:27; and one  
5 eukaryotic protein kinase domain consensus derived from a hidden Markov model (HMM) (PF00069; SEQ ID NO:28) from amino acid 40-293, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:29. For general information regarding PFAM identifiers, PS prefix and PF prefix domain identification numbers, refer to Sonnhammer et al. (1997) *Protein* 28:405-420 and [www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html](http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html).

10 The HKID-1 polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 was analyzed with the MEMSAT transmembrane domain prediction software. MEMSAT predicted three potential transmembrane domains in the HKID-1 polypeptide sequence of SEQ ID NO:2: amino acid 42 to 58 (SEQ ID NO:42), amino acid 78 to 94 (SEQ ID NO:43), and amino acid 226 to 245 (SEQ ID NO:44). Because the rat ortholog of HKID-1, rat  
15 KID-1, is known to be a soluble protein, it is likely that the potential transmembrane domains predicted by MEMSAT represent hydrophobic domains of HKID-1 protein involved in hydrophobic interactions in the core of the HKID-1 protein and not transmembrane domains.

In an embodiment of the invention, the HKID-1 molecules are protein kinases  
20 which are expressed and/or function in cells of the nervous system, as a nonlimiting example, cells of the hippocampus and cortex.

As used herein, the term "protein kinase" includes a protein or polypeptide which is capable of modulating its own phosphorylation state or the phosphorylation state of another protein or polypeptide. Protein kinases can have a specificity for (i.e.,  
25 a specificity to phosphorylate) serine/threonine residues, tyrosine residues, or both serine/threonine and tyrosine residues, e.g., the dual specificity kinases. Specificity of a protein kinase for phosphorylation of either tyrosine or serine/threonine can be predicted by the sequence of two of the subdomains, VIb and VIII, (described in, for example, Hanks et al. (1988) *Science* 241:42-52, the contents of which are  
30 incorporated herein by reference).

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Protein kinases play a role in signaling pathways associated with cells expressing them. Thus, since the HKID-1 molecules are expressed in neuronal cells, HKID-1 may be involved in: 1) nervous system disorders; 2) seizures; 3) epilepsy; 4) learning; 5) memory; or 6) synaptic plasticity. HKID-1 may also be involved in proliferative disorders, such as cancer, because HKID-1 is the paralog of the PIM-1 proteins which are known to be proto-oncogenes.

Examples of cellular proliferative and/or differentiative disorders include cancer, e.g., carcinoma, sarcoma, metastatic disorders or hematopoietic neoplastic disorders, e.g., leukemias. A metastatic tumor can arise from a multitude of primary tumor types, including but not limited to those of prostate, colon, lung, breast and liver origin.

As used herein, the terms "cancer", "hyperproliferative" and "neoplastic" refer to cells having the capacity for autonomous growth, i.e., an abnormal state or condition characterized by rapidly proliferating cell growth. Hyperproliferative and neoplastic disease states may be categorized as pathologic, i.e., characterizing or constituting a disease state, or may be categorized as non-pathologic, i.e., a deviation from normal but not associated with a disease state. The term is meant to include all types of cancerous growths or oncogenic processes, metastatic tissues or malignantly transformed cells, tissues, or organs, irrespective of histopathologic type or stage of invasiveness. "Pathologic hyperproliferative" cells occur in disease states characterized by malignant tumor growth. Examples of non-pathologic hyperproliferative cells include proliferation of cells associated with wound repair.

The terms "cancer" or "neoplasms" include malignancies of the various organ systems, such as affecting lung, breast, thyroid, lymphoid, gastrointestinal, and genitourinary tract, as well as adenocarcinomas which include malignancies such as most colon cancers, renal-cell carcinoma, prostate cancer and/or testicular tumors, non-small cell carcinoma of the lung, cancer of the small intestine and cancer of the esophagus.

The term "carcinoma" is art recognized and refers to malignancies of epithelial or endocrine tissues including respiratory system carcinomas, gastrointestinal system carcinomas, genitourinary system carcinomas, testicular carcinomas, breast

WO 03/029434

PCT/US02/31948

carcinomas, prostatic carcinomas, endocrine system carcinomas, and melanomas.

Exemplary carcinomas include those forming from tissue of the cervix, lung, prostate, breast, head and neck, colon and ovary. The term also includes carcinosarcomas, e.g., which include malignant tumors composed of carcinomatous and sarcomatous tissues.

- 5 An "adenocarcinoma" refers to a carcinoma derived from glandular tissue or in which the tumor cells form recognizable glandular structures.

The term "sarcoma" is art recognized and refers to malignant tumors of mesenchymal derivation.

Hematopoietic neoplastic disorders include diseases involving

- 10 hyperplastic/neoplastic cells of hematopoietic origin, e.g., arising from myeloid, lymphoid or erythroid lineages, or precursor cells thereof. Preferably, the diseases arise from poorly differentiated acute leukemias, e.g., erythroblastic leukemia and acute megakaryoblastic leukemia. Additional exemplary myeloid disorders include, but are not limited to, acute promyeloid leukemia (APML), acute myelogenous  
15 leukemia (AML) and chronic myelogenous leukemia (CML) (reviewed in Vaickus, L. (1991) *Crit. Rev. in Oncol./Hematol.* 11:267-97); lymphoid malignancies include, but are not limited to acute lymphoblastic leukemia (ALL) which includes B-lineage ALL and T-lineage ALL, chronic lymphocytic leukemia (CLL), prolymphocytic leukemia (PLL), hairy cell leukemia (HLL) and Waldenstrom's macroglobulinemia (WM).  
20 Additional forms of malignant lymphomas include, but are not limited to non-Hodgkin lymphoma and variants thereof, peripheral T cell lymphomas, adult T cell leukemia/lymphoma (ATL), cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), large granular lymphocytic leukemia (LGF), Hodgkin's disease and Reed-Sternberg disease.

- 25 Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections.

#### I. Isolated Nucleic Acid Molecules

- The HKID-1 cDNA sequence (SEQ ID NO:1), which is approximately 2126 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-  
30 initiated coding sequence of 978 base pairs (nucleotides 171-1259 of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3) encoding a 326 amino acid protein (SEQ ID NO:2) having a predicted

WO 03/029434

PCT/US02/31948

molecular weight of approximately 35.86 kDa (excluding post-translational modifications) (Fig. 1).

One aspect of the invention provides isolated nucleic acid molecules that encode HKID-1 proteins or biologically active portions thereof, as well as nucleic acid molecules sufficient for use as hybridization probes to identify HKID-1-encoding nucleic acids (e.g., HKID-1 mRNA) and fragments for use as PCR primers for the amplification or mutation of HKID-1 nucleic acid molecules. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (e.g., cDNA or genomic DNA) and RNA molecules (e.g., mRNA) and analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

An "isolated" nucleic acid molecule is one which is separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences (preferably protein encoding sequences) which naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated HKID-1 nucleic acid molecule can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

An isolated nucleic acid molecule of the present invention, e.g., a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a complement of any of these nucleotide sequences, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. Using all or a portion of the nucleic acid sequences of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, as a hybridization probe, HKID-1 nucleic acid molecules can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (e.g., as described in Sambrook et al., eds.,

WO 03/029434

PCT/US02/31948

*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).*

A nucleic acid molecule of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or genomic DNA as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. The nucleic acid so amplified can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. Furthermore, oligonucleotides corresponding to HKID-1 nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, e.g., using an automated DNA synthesizer.

The invention features an isolated nucleic acid molecule which is at least 26% (or 30%, 35%, 40%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, or 98%) identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or a complement thereof. The invention also features an isolated nucleic acid molecule which is at least 43% (or 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, or 98%) identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:3 or a complement thereof.

The invention also features an isolated nucleic acid molecule which includes a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence that is at least 95.5% (or 95.8%, 96%, 96.5%, 97%, 98% or 99%) identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

In an embodiment, an isolated HKID-1 nucleic acid molecule has the nucleotide sequence shown SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

Also within the invention is an isolated nucleic acid molecule which encodes a fragment of a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, the fragment including at least 15 (or 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 270, 290, 310 or 326) contiguous amino acids of SEQ ID NO:2.

Moreover, the isolated nucleic acid molecule of the invention can comprise only a portion of an isolated nucleic acid sequence encoding HKID-1, for example, a fragment which can be used as a probe or primer or a fragment encoding a biologically active portion of HKID-1, for example, fragments comprising nucleotides 306 to 332 of SEQ ID NO:1, encoding the protein kinase ATP-binding region signature domain of HKID-1, nucleotides 666 to 704 of SEQ ID NO:1, encoding the serine/threonine protein kinase active site signature domain of HKID-1, and

WO 03/029434

PCT/US02/31948

nucleotides 288 to 1049 of SEQ ID NO:1 encoding the eukaryotic protein kinase domain of HKID-1.

The nucleotide sequence determined from the human HKID-1 gene and/or cDNA allows for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning HKID-1 homologs in other cell types, e.g., from other tissues, as well as HKID-1 orthologs and homologs from other mammals. The probe/primer typically comprises a substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12, preferably about 25, more preferably about 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 or 400 consecutive nucleotides of the sense or anti-sense sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or of a naturally occurring mutant and/or allelic variant of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

Probes based on the human HKID-1 nucleotide sequence can be used to detect transcripts, cDNAs, or genomic sequences encoding the same or identical proteins or allelic variants thereof. The probe comprises a label group attached thereto, e.g., a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissues which mis-express an HKID-1 protein, such as by measuring levels of an HKID-1-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject, e.g., detecting HKID-1 mRNA levels or determining whether a genomic HKID-1 gene has been mutated or deleted.

Another embodiment of the invention features isolated HKID-1 nucleic acid molecules which specifically detect HKID-1 nucleic acid molecules relative to nucleic acid molecules encoding other members of the serine/threonine protein kinase superfamily. For example, in one embodiment, an isolated HKID-1 nucleic acid molecule hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or a complement thereof. In another embodiment, an isolated HKID-1 nucleic acid molecule is at least 547 (or 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2126 or 2200) nucleotides in length and hybridizes under stringent conditions to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or a complement thereof. In another embodiment, an

WO 03/029434

PCT/US02/31948

isolated HKID-1 nucleic acid molecule comprises nucleotides 306 to 332 of SEQ ID NO:1, encoding the protein kinase ATP-binding region signature domain of HKID-1, or a complement thereof. In yet another embodiment, an isolated HKID-1 nucleic acid molecule comprises nucleotides 666 to 704 of SEQ ID NO:1, encoding the  
5 serine/threonine protein kinase active site signature domain of HKID-1, or a complement thereof. In another embodiment, an isolated HKID-1 nucleic acid molecule comprises nucleotides 288 to 1049 of SEQ ID NO:1 encoding the eukaryotic protein kinase domain of HKID-1, or a complement thereof. In another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule which is antisense to the  
10 coding strand of an HKID-1 nucleic acid.

An isolated nucleic acid fragment encoding a "biologically active portion of HKID-1" can be prepared by isolating a portion of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, expressing the encoded portion of HKID-1 protein (e.g., by recombinant expression *in vitro*) and assessing the activity of the encoded portion of HKID-1. For example, an  
15 isolated nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of HKID-1 includes one or more of a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (PS00004; SEQ ID NO:4), for example, from amino acids 260-263 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:5; a protein kinase C phosphorylation site (PS00005; SEQ ID NO:6), for example, from amino acids 137-139, 275-277, and  
20 279-281, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:7-9; a casein kinase II phosphorylation site (PS00006; SEQ ID NO:10), for example, from amino acids 202-205, 211-214, and 321-324, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:11-13; a tyrosine kinase phosphorylation site (PS00007; SEQ ID NO:14), for example, from amino acid 33-40, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:15; an N-myristoylation sites (PS00008; SEQ ID NO:16) from  
25 amino acids 43-48, 49-54, 57-62, 63-68, 80-85, 98-103, and 295-300 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:17-23; a protein kinase ATP-binding region signature (PS00107; SEQ ID NO:24), for example, from amino acid 46-54, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:25; a serine/threonine protein kinase active site signature (PS00108; SEQ ID NO:26), for example, from amino acid 166-178, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:27;  
30 and a eukaryotic protein kinase domain (PF00069; SEQ ID NO:28), for example, from amino acid 40-293, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:29.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

The invention further encompasses isolated nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 due to degeneracy of the genetic code and thus encode the same HKID-1 protein as that encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

5 In addition to the human HKID-1 nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, it will be appreciated by those skilled in the art that DNA sequence polymorphisms that lead to changes in the amino acid sequences of HKID-1 may exist within a population (e.g., the human population). Such genetic polymorphism in the HKID-1 gene may exist among individuals within a population due to natural allelic variation. An allele is one of a group of genes which occur alternatively at a given genetic locus. As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules comprising an open reading frame encoding an HKID-1 protein, preferably a mammalian HKID-1 protein. As used herein, the phrase "allelic variant" refers to a nucleotide sequence which occurs at an HKID-1 locus or to a polypeptide encoded by the nucleotide sequence. Such natural allelic variations can typically result in 1-5% variance in the nucleotide sequence of the HKID-1 gene. Alternative alleles can be identified by sequencing the gene of interest in a number of different individuals. This can be readily carried out by using hybridization probes to identify the same genetic locus in a variety of individuals. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms or variations in HKID-1 that are the result of natural allelic variation and that do not alter the functional activity of HKID-1 are intended to be within the scope of the invention. Allelic variants of HKID-1 will physically and genetically map to the HKID-1 genetic and physical locus shown in Example 5 to be chromosome 22 between the D22S1169 and D22S\_qter markers, 196.70 centiRays from the top of the chromosome 22 linkage group.

The invention includes an isolated nucleic acid molecule which encodes a naturally occurring allelic variant, encoding a fully functional protein, a partially functional HKID-1 protein, or a non functional protein, of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the nucleic acid molecule

WO 03/029434

PCT/US02/31948

hybridizes to a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or a complement thereof under stringent conditions.

Moreover, isolated nucleic acid molecules encoding HKID-1 proteins from other species (HKID-1 homologs or orthologs), which have a nucleotide sequence which differs from that of a human HKID-1, are intended to be within the scope of the invention, excluding those known in the art, e.g., the rat and *Xenopus laevis* (frog) species orthologs of HKID-1. Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants, homologs, and orthologs of the HKID-1 cDNA of the invention can be isolated based on their identity to the human HKID-1 nucleic acids disclosed herein using the human cDNAs, or a portion thereof, as a hybridization probe according to standard hybridization techniques under stringent hybridization conditions. Orthologs of HKID-1 will often map to genetic loci that are syntenic with the human HKID-1 genetic and physical locus shown in Example 5 to be chromosome 22 between the D22S1169 and D22S\_qter markers, 196.70 centiRays from the top of the chromosome 22 linkage group.

In another embodiment of the invention, an isolated nucleic acid molecule of the invention is 1) at least 547 (or 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100 or 2126) nucleotides of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1; or 2) at least 415 (or 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900 or 978) nucleotides of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:3; or 3) at least 8 (or 10, 15, 20, 25, 35, 45, 65, 85, 105, 125, 175, 225, 275, 325, 375, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 or 923) nucleotides from nucleotide 1-923 of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:30; or 4) at least 8 (or 10, 15, 20, 25, 35, 45, 65, 85, 105, 125, 175, 225, 275, 325 or 344) nucleotides from nucleotide 1-344 of SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:31 and hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence, preferably the coding sequence, of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or a complement thereof.

In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention comprises a nucleic acid molecule which is a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a portion thereof. A nucleic acid molecule which is complementary to a given nucleotide sequence is one which is

WO 03/029434

PCT/US02/31948

sufficiently complementary to the given nucleotide sequence that it can hybridize to the given nucleotide sequence under stringent conditions.

As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" describes conditions for hybridization and washing. Stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. A preferred, example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 50°C. Another example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 55°C. A further example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C. Preferably, stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Particularly preferred stringency conditions (and the conditions that should be used if the practitioner is uncertain about what conditions should be applied to determine if a molecule is within a hybridization limitation of the invention) are 0.5M Sodium Phosphate, 7% SDS at 65°C, followed by one or more washes at 0.2X SSC, 1% SDS at 65°C. Preferably, an isolated nucleic acid molecule of the invention that hybridizes under stringent conditions to the sequence of SEQ ID NO:1, or SEQ ID NO:3, corresponds to a naturally-occurring nucleic acid molecule.

As used herein, a "naturally-occurring" nucleic acid molecule refers to an RNA or DNA molecule having a nucleotide sequence that occurs in nature (e.g., encodes a natural protein).

In addition to naturally-occurring allelic variants of the HKID-1 sequence that may exist in the population, the skilled artisan will further appreciate that changes can be introduced by mutation into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, thereby leading to changes in the amino acid sequence of the encoded HKID-1 protein, without altering the biological activity of the HKID-1 protein. For example,

WO 03/029434

PCT/US02/31948

one can make nucleotide substitutions leading to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of HKID-1 (e.g., the sequence of SEQ ID NO:2) without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are not conserved or only semi-conserved among HKID-1 of various species may be non-essential for activity and thus would be likely targets for alteration. Alternatively, amino acid residues that are conserved among the HKID-1 proteins of various species may be essential for activity and thus would not be likely targets for alteration.

For example, HKID-1 proteins of the present invention contain at least one conserved protein kinase ATP-binding region signature (PS00107; SEQ ID NO:24) from amino acid 46-54, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:25; at least one conserved serine/threonine protein kinase active site signature (PS00108; SEQ ID NO:26) from amino acid 166-178, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:27; and at least one conserved eukaryotic protein kinase domain (PF00069; SEQ ID NO:28) from amino acid 40-293, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:29. For example, HKID-1 proteins of the present invention may contain at least one conserved or nonconserved cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (PS00004; SEQ ID NO:4), for example, from amino acids 260-263 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:5; protein kinase C phosphorylation site (PS00005; SEQ ID NO:6), for example, from amino acids 137-139, 275-277, and 279-281, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:7-9; casein kinase II phosphorylation site (PS00006; SEQ ID NO:10), for example, from amino acids 202-205, 211-214, and 321-324, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:11-13; tyrosine kinase phosphorylation site (PS00007; SEQ ID NO:14), for example, from amino acid 33-40, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:15; N-myristoylation site (PS00008; SEQ ID NO:16), for example, from amino acids 43-48, 49-54, 57-62, 63-68, 80-85, 98-103, and 295-300 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:17-23.

Accordingly, another aspect of the invention provides nucleic acid molecules encoding HKID-1 proteins that contain changes in amino acid residues that are not essential for activity. Such HKID-1 proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2 yet retain biological activity. In one embodiment, the isolated nucleic acid

WO 03/029434

PCT/US02/31948

molecule includes a nucleotide sequence encoding a protein that includes an amino acid sequence that is at least about 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

An isolated nucleic acid molecule encoding an HKID-1 protein having a sequence which differs from that of SEQ ID NO:2 can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein. Mutations can be introduced by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in HKID-1 is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of an HKID-1 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for HKID-1 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis, the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined.

In an embodiment, a mutant HKID-1 can be assayed for (1) the ability to be phosphorylated by protein kinases, (2) the ability to be N-myristoylated, (3) the ability to bind ATP, (4) the ability to phosphorylate proteins, and (5) the ability to phosphorylate proteins specifically on serine and threonine residues. In another embodiment, mutant HKID-1 can be assayed for its ability to play a role in signaling

WO 03/029434

PCT/US02/31948

pathways associated with cells that express HKID-1, e.g. cells of the nervous system, the ability to form protein-protein interaction with its substrate proteins expressed in cells in which HKID-1 is expressed, and the ability to form protein-protein interactions with proteins in the signal transduction and biological pathways that exist in cells in which HKID-1 is expressed.

The present invention further encompasses antisense nucleic acid molecules, i.e., molecules which are complementary to a sense nucleic acid encoding a protein, e.g., complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. Accordingly, an antisense nucleic acid can hydrogen bond to a sense nucleic acid. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire HKID-1 coding strand, or to only a portion thereof, e.g., all or part of the protein coding region (or open reading frame). An antisense nucleic acid molecule can be antisense to a noncoding region of the coding strand of a nucleotide sequence encoding HKID-1. The noncoding regions ("5' and 3' untranslated regions") are the 5' and 3' sequences which flank the coding region and are not translated into amino acids.

Given the coding strand sequences encoding HKID-1 disclosed herein (e.g., SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3), antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of HKID-1 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of HKID-1 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of HKID-1 mRNA, e.g., an oligonucleotide having the sequence AGAGCAGCATCGCGGGCGACGGC (SEQ ID NO:35) or AGCAGCATCGCGGGCGAC (SEQ ID NO:36). An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (e.g., an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides

WO 03/029434

PCT/US02/31948

designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the antisense and sense nucleic acids, e.g., phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used. Examples of modified nucleotides which can be used to generate the antisense nucleic acid include 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (i.e., RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject or generated *in situ* such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding an HKID-1 protein to thereby inhibit expression of the protein, e.g., by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule which binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention includes direct injection at a tissue site. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered

WO 03/029434

PCT/US02/31948

systemically. For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, e.g., by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies which bind to cell surface receptors or antigens. The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient intracellular concentrations of the antisense molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

An antisense nucleic acid molecule of the invention can be an  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule. An  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual  $\beta$ -units, the strands run parallel to each other (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-*o*-methylribonucleotide (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

The invention also encompasses ribozymes. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity which are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (e.g., hammerhead ribozymes (described in Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) can be used to catalytically cleave HKID-1 mRNA transcripts to thereby inhibit translation of HKID-1 mRNA. A ribozyme having specificity for an HKID-1-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of an HKID-1 cDNA disclosed herein (e.g., SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3). For example, a derivative of a *Tetrahymena* L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in an HKID-1-encoding mRNA. See, e.g., Cech et al. U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech et al. U.S. Patent No. 5,116,742. Alternatively, HKID-1 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, e.g., Bartel and Szostak (1993) *Science* 261:1411-1418.

The invention also encompasses nucleic acid molecules which form triple helical structures. For example, HKID-1 gene expression can be inhibited by

WO 03/029434

PCT/US02/31948

targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the HKID-1 (e.g., the HKID-1 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the HKID-1 gene in target cells. *See generally* Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27; and  
5 Maher (1992) *Bioassays* 14(12):807.

In embodiments, the nucleic acid molecules of the invention can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, e.g., the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acids can be modified to generate peptide nucleic acids (*see*  
10 Hyrup et al. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4:5). As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics, e.g., DNA mimics, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of  
15 PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup et al. (1996), *supra*; Perry-O'Keefe et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670.

PNAs of HKID-1 can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific  
20 modulation of gene expression by, e.g., inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of HKID-1 can also be used, e.g., in the analysis of single base pair mutations in a gene by, e.g., PNA directed PCR clamping; as artificial restriction enzymes when used in combination with other enzymes, e.g., S1 nucleases (Hyrup (1996), *supra*; or as probes or primers for DNA sequence and hybridization  
25 (Hyrup (1996), *supra*; Perry-O'Keefe et al. (1996), *supra*).

In another embodiment, PNAs of HKID-1 can be modified, e.g., to enhance their stability, specificity or cellular uptake, by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. The synthesis of PNA-DNA  
30 chimeras can be performed as described in Hyrup (1996), *supra*, Finn et al. (1996)

WO 03/029434

PCT/US02/31948

*Nucleic Acids Res.* 24(17):3357-63, Mag et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:5973, and Peterser et al. (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5:1119.

## II. Isolated HKID-1 Proteins

5 One aspect of the invention provides isolated HKID-1 proteins, and biologically active portions thereof, as well as polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-HKID-1 antibodies. In one embodiment, native HKID-1 proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, 10 HKID-1 proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, an HKID-1 protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

An "isolated" or "purified" protein or biologically active portion thereof is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or 15 tissue source from which the HKID-1 protein is derived, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of HKID-1 protein in which the protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. Thus, HKID-1 protein that is substantially free of 20 cellular material includes preparations of HKID-1 protein having less than about 30%, 20%, 10%, or 5% (by dry weight) of non-HKID-1 protein (also referred to herein as a "contaminating protein"). When the HKID-1 protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, 10%, or 5% of the 25 volume of the protein preparation. When HKID-1 protein is produced by chemical synthesis, it is preferably substantially free of chemical precursors or other chemicals, i.e., it is separated from chemical precursors or other chemicals which are involved in the synthesis of the protein. Accordingly such preparations of HKID-1 protein have less than about 30%, 20%, 10%, 5% (by dry weight) of chemical precursors or non- 30 HKID-1 chemicals.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

In one embodiment, the isolated proteins of the present invention, preferably HKID-1 proteins, are identified based on the presence in them of at least one "protein kinase ATP-binding site" and at least one "serine/threonine protein kinase active site" and that they have an amino acid sequence which is at least 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 85%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99% or more homologous to an amino acid sequence including SEQ ID NO:2. As used herein, the term "protein kinase ATP-binding site" includes an amino acid sequence with significant amino acid sequence similarity to the protein kinase ATP-binding region signature sequence (PS00107) of SEQ ID NO:24 which is conserved in protein kinases. As used herein, the term "serine/threonine protein kinase active site" includes an amino acid sequence with significant amino acid sequence similarity to the serine/threonine protein kinase active site signature sequence (PS00108) of SEQ ID NO:26 which is conserved in protein kinases that phosphorylate serine and threonine residues on proteins.

In another embodiment, the isolated proteins of the present invention, preferably HKID-1 proteins, are identified based on the presence of at least one eukaryotic protein kinase domain and that they have an amino acid sequence which is at least 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 85%, 90%, 95%, 96%, 98%, 99% or more homologous to an amino acid sequence including SEQ ID NO:2. As used herein, the term "eukaryotic protein kinase domain" includes an amino acid sequence with significant amino acid sequence similarity to the eukaryotic protein kinase domain sequence (PF00069) of SEQ ID NO:28 which is conserved in protein kinases.

Yet another embodiment of the invention includes an isolated HKID-1 protein which is encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence that is at least about 43% (or 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, or 98%) identical to SEQ ID NO:3; an isolated HKID-1 protein which is encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence at least about 65%, preferably 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical to the portions of SEQ ID NO:1 encoding the cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (PS00004; SEQ ID NO:4) from amino acids 260-263 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:5; the three protein kinase C phosphorylation sites (PS00005; SEQ ID NO:6) from amino acids 137-139, 275-277, and 279-281, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:7-

WO 03/029434

PCT/US02/31948

9; the three casein kinase II phosphorylation sites (PS00006; SEQ ID NO:10) from amino acids 202-205, 211-214, and 321-324, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:11-13; the tyrosine kinase phosphorylation site (PS00007; SEQ ID NO:14) from amino acid 33-40, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:15; the seven N-myristoylation sites (PS00008; SEQ ID NO:16) from amino acids 43-48, 49-54, 57-62, 63-68, 80-85, 98-103, and 295-300 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:17-23; and an isolated HKID-1 protein which is encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence at least about 65%, preferably 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical to the portions of SEQ ID NO:1 encoding the protein kinase ATP-binding region signature (PS00107; SEQ ID NO:24) from amino acid 46-54, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:25 (e.g., about nucleotides 306 to 332 of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:32); the serine/threonine protein kinase active site signature (PS00108; SEQ ID NO:26) from amino acid 166-178, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:27 (e.g., about nucleotides 666 to 704 of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:33); and the eukaryotic protein kinase domain (PF00069; SEQ ID NO:28) from amino acid 40-293, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:29 (e.g., about nucleotides 288 to 1049 of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:34) and an isolated HKID-1 protein which is encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence which hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, or the complement thereof.

Biologically active portions of an HKID-1 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently identical to or derived from the amino acid sequence of the HKID-1 protein (e.g., the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2), which include fewer amino acids than the full length HKID-1 proteins, and exhibit at least one activity of an HKID-1 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the HKID-1 protein. A biologically active portion of an HKID-1 protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100 or more amino acids in length. Biologically active polypeptides include one or more identified HKID-1 structural domains, e.g., a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (PS00004; SEQ ID NO:4), for example, from amino acids 260-263 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:5; a

WO 03/029434

PCT/US02/31948

protein kinase C phosphorylation site (PS00005; SEQ ID NO:6), for example, from amino acids 137-139, 275-277, and 279-281, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:7-9; a casein kinase II phosphorylation site (PS00006; SEQ ID NO:10), for example, from amino acids 202-205, 211-214, and 321-324, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:11-13; a tyrosine kinase phosphorylation site (PS00007; SEQ ID NO:14), for example, from amino acid 33-40, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:15; an N-myristoylation site (PS00008; SEQ ID NO:16), for example, from amino acids 43-48, 49-54, 57-62, 63-68, 80-85, 98-103, and 295-300 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:17-23; a protein kinase ATP-binding region signature (PS00107; SEQ ID NO:24), for example, from amino acid 46-54, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:25; a serine/threonine protein kinase active site signature (PS00108; SEQ ID NO:26), for example, from amino acid 166-178, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:27; and an eukaryotic protein kinase domain (PF00069; SEQ ID NO:28), for example, from amino acid 40-293, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:29.

Moreover, other biologically active portions, in which other regions of the protein are deleted, can be prepared by recombinant techniques and evaluated for one or more of the functional activities of a native HKID-1 protein.

HKID-1 protein has the amino acid sequence shown of SEQ ID NO:2. Other useful HKID-1 proteins are substantially identical to SEQ ID NO:2 and retain the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2 yet differ in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis. For example, such HKID-1 proteins and polypeptides possess at least one biological activity described herein such as, (1) the ability to be phosphorylated by protein kinases, (2) the ability to be N-myristoylated, (3) the ability to bind ATP, (4) the ability to phosphorylate proteins, (5) the ability to phosphorylate proteins specifically on serine and threonine residues, (6) the ability to play a role in signaling pathways associated with cells that express HKID-1, e.g. cells of the nervous system, (7) the ability to form protein-protein interaction with its substrate proteins expressed in cells in which HKID-1 is expressed, and (8) the ability to form protein-protein interactions with proteins in the signal transduction and biological pathways that exist in cells in which HKID-1 is expressed. Accordingly, a useful isolated HKID-1 protein is a protein which includes

WO 03/029434

PCT/US02/31948

an amino acid sequence at least about 45%, preferably 55%, 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and retains the functional activity of the HKID-1 proteins of SEQ ID NO:2. In other instances, the HKID-1 protein is a protein having an amino acid sequence 55%, 65%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 98% or 99% identical to one or more of the HKID-1 domains including one cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (PS00004; SEQ ID NO:4) from amino acids 260-263 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:5; three protein kinase C phosphorylation sites (PS00005; SEQ ID NO:6) from amino acids 137-139, 275-277, and 279-281, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:7-9; three casein kinase II phosphorylation sites (PS00006; SEQ ID NO:10) from amino acids 202-205, 211-214, and 321-324, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:11-13; one tyrosine kinase phosphorylation site (PS00007; SEQ ID NO:14) from amino acid 33-40, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:15; seven N-myristoylation sites (PS00008; SEQ ID NO:16) from amino acids 43-48, 49-54, 57-62, 63-68, 80-85, 98-103, and 295-300 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:17-23; one protein kinase ATP-binding region signature (PS00107; SEQ ID NO:24) from amino acid 46-54, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:25; one serine/threonine protein kinase active site signature (PS00108; SEQ ID NO:26) from amino acid 166-178, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:27; and one eukaryotic protein kinase domain (PF00069; SEQ ID NO:28) from amino acid 40-293, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:29. In an embodiment, the HKID-1 protein retains a functional activity of the HKID-1 protein of SEQ ID NO:2.

To determine the percent identity of two amino acid sequences, or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, 90%, 100% of the length of the reference sequence. The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is

WO 03/029434

PCT/US02/31948

occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In a preferred embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453 algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another preferred embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package (available at [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. A particularly preferred set of parameters (and the one that should be used if the practitioner is uncertain about what parameters should be applied to determine if a molecule is within a sequence identity or homology limitation of the invention) is using a Blossum 62 scoring matrix with a gap open penalty of 12, a gap extend penalty of 4, and a frameshift gap penalty of 5.

The percent identity between two amino acid or nucleotide sequences can be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (1989) *CABIOS* 4:11-17 which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

The nucleic acid and protein sequences described herein can be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for example, identify other family members or related sequences. Such searches can be performed using the NBLAST and XBLAST programs (version 2.0) of Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST nucleotide searches can be performed with the

WO 03/029434

PCT/US02/31948

NBLAST program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to HKID-1 nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to HKID-1 protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) can be used. See [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

10 The percent identity between two sequences can be determined using techniques similar to those described above, with or without allowing gaps. In calculating percent identity, only exact matches are counted.

The invention also provides HKID-1 chimeric or fusion proteins. As used herein, an HKID-1 "chimeric protein" or "fusion protein" comprises an HKID-1 polypeptide operably linked to a non-HKID-1 polypeptide. A "HKID-1 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to HKID-1, whereas a "non-HKID-1 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially identical to the HKID-1 protein, e.g., a protein which is different from the HKID-1 protein and which is derived from the same or a different organism. Within an HKID-1 fusion protein the HKID-1 polypeptide can correspond to all or a portion of an HKID-1 protein, preferably at least one biologically active portion of an HKID-1 protein. Within the fusion protein, the term "operably linked" is intended to indicate that the HKID-1 polypeptide and the non-HKID-1 polypeptide are fused in-frame to each other. The non-HKID-1 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the HKID-1 polypeptide.

25 One useful isolated fusion protein is a GST-HKID-1 fusion protein in which the HKID-1 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant HKID-1.

30 In another embodiment, the fusion protein is an HKID-1 protein containing an heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (e.g., mammalian

WO 03/029434

PCT/US02/31948

host cells), expression and/or secretion of HKID-1 can be increased through use of a heterologous signal sequence. For example, the gp67 secretory sequence of the baculovirus envelope protein can be used as a heterologous signal sequence (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992).

5 Other examples of eukaryotic heterologous signal sequences include the secretory sequences of melittin and human placental alkaline phosphatase (Stratagene; La Jolla, California). In yet another example, useful prokaryotic heterologous signal sequences include the phoA secretory signal (Sambrook et al., *supra*) and the protein A secretory signal (Pharmacia Biotech; Piscataway, New Jersey).

10 In yet another embodiment, the fusion protein is an HKID-1-immunoglobulin fusion protein in which all or part of HKID-1 is fused to sequences derived from a member of the immunoglobulin protein family.

Preferably, an HKID-1 chimeric or fusion protein of the invention is produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for  
15 the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, for example by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene  
20 can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers which give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments which can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (*see, e.g., Ausubel et al., supra*). Moreover, many  
25 expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (e.g., a GST polypeptide). An HKID-1-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the HKID-1 protein.

The present invention also provides variants of the HKID-1 proteins (i.e.,  
30 proteins having a sequence which differs from that of the HKID-1 amino acid sequence). Such variants can function as either HKID-1 agonists (mimetics) or as

WO 03/029434

PCT/US02/31948

HKID-1 antagonists. Variants of the HKID-1 protein can be generated by mutagenesis, e.g., discrete point mutation or truncation of the HKID-1 protein. An agonist of the HKID-1 protein can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of the HKID-1 protein, e.g., (1) the ability to be phosphorylated by protein kinases, (2) the ability to be N-myristoylated, (3) the ability to bind ATP, (4) the ability to phosphorylate proteins, (5) the ability to phosphorylate proteins specifically on serine and threonine residues, (6) the ability to play a role in signaling pathways associated with cells that express HKID-1, e.g. cells of the nervous system, (7) the ability to form protein-protein interaction with its substrate proteins expressed in cells in which HKID-1 is expressed, and (8) the ability to form protein-protein interactions with proteins in the signal transduction and biological pathways that exist in cells in which HKID-1 is expressed. An antagonist of the HKID-1 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the HKID-1 protein by, for example, competitively binding to a downstream or upstream member of a cellular signaling cascade which includes the HKID-1 protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. Treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein can have fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the HKID-1 proteins.

Treatment is defined as the application or administration of a therapeutic agent to a patient, or application or administration of a therapeutic agent to an isolated tissue or cell line from a patient, who has a disease, a symptom of disease or a predisposition toward a disease, with the purpose to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve or affect the disease, the symptoms of disease or the predisposition toward disease. "Subject", as used herein, can refer to a mammal, e.g., a human, or to an experimental animal or disease model. The subject can also be a non-human animal, e.g., a horse, cow, goat, or other domestic animal. A therapeutic agent includes, but is not limited to, small molecules, peptides, antibodies, ribozymes and antisense oligonucleotides.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Variants of the HKID-1 protein which function as either HKID-1 agonists (mimetics) or as HKID-1 antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, e.g., truncation mutants, of the HKID-1 protein for HKID-1 protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of  
5 HKID-1 variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of HKID-1 variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential HKID-1 sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger  
10 fusion proteins (e.g., for phage display) containing the set of HKID-1 sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential HKID-1 variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector.  
15 Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential HKID-1 sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (*see, e.g., Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477*).  
20 In addition, libraries of fragments of the HKID-1 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of HKID-1 fragments for screening and subsequent selection of variants of an HKID-1 protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of an HKID-1 coding sequence with a nuclease under conditions wherein  
25 nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, an expression library can be derived which  
30 encodes N-terminal and internal fragments of various sizes of the HKID-1 protein.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of HKID-1 proteins. The most widely used techniques, which are amenable to high through-put analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify HKID-1 variants (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

Also within the invention is an isolated polypeptide which is a naturally occurring allelic variant, comprising a fully functional protein, a partially functional protein, or a non functional protein, of a polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the polypeptide is encoded by a nucleic acid molecule which hybridizes to a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 or a complement thereof under stringent conditions. The allelic variants of HKID-1 will be encoded by a gene that will physically and genetically map to the HKID-1 genetic and physical locus shown in Example 5 to be chromosome 22 between the D22S1169 and D22S\_qter markers, 196.70 centiRays from the top of the chromosome 22 linkage group.

Also within the invention is an isolated polypeptide which is a species ortholog of HKID-1, a polypeptide that includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the polypeptide is encoded by a nucleic acid molecule which hybridizes to a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 or a complement thereof under stringent conditions. Species orthologs of HKID-1 will often physically and genetically map to the region of the genome of the species from which they originate that is syntenic to human chromosome 22 between the D22S1169

WO 03/029434

PCT/US02/31948

and D22S\_qter markers, 196.70 centiRays from the top of the chromosome 22 linkage group.

### III. Anti-HKID-1 Antibodies

5 The present invention further provides antibodies that bind to the HKID-1 proteins of the present invention. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site which specifically binds an antigen, such as HKID-1. A molecule which specifically binds to HKID-1 is a  
10 molecule which binds HKID-1, but does not substantially bind other molecules in a sample, e.g., a biological sample, which naturally contains HKID-1. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include F(ab) and F(ab')<sub>2</sub> fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin. The invention provides polyclonal and monoclonal antibodies that  
15 bind HKID-1. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of HKID-1. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular HKID-1 protein with which it  
20 immunoreacts.

An isolated HKID-1 protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind HKID-1 using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. The full-length HKID-1 protein can be used or, alternatively, the invention provides antigenic peptide fragments of HKID-  
25 1 for use as immunogens. The antigenic peptide of HKID-1 comprises at least 8 (preferably 10, 15, 20, or 30) amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and encompasses an epitope of HKID-1 such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with HKID-1.

Epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of HKID-1 that are  
30 located on the surface of the protein. A surface probability analysis, presented in Figure 3, of the polypeptide sequence (SEQ ID NO:2) of human HKID-1 protein

WO 03/029434

PCT/US02/31948

identifies probable antigenic regions; amino acid 28 to 39, amino acid 124 to 129, and amino acid 277 to 283 are particularly likely to be localized to the surface of the protein and, therefore, are likely to encode surface residues useful for targeting antibody production.

5 AN HKID-1 immunogen typically is used to prepare antibodies by immunizing a suitable subject, (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) with the immunogen. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, recombinantly expressed HKID-1 protein or a chemically synthesized HKID-1 polypeptide. The preparation can further include an adjuvant, such as Freund's  
10 complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic HKID-1 preparation induces a polyclonal anti-HKID-1 antibody response.

Polyclonal anti-HKID-1 antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with an HKID-1 immunogen. The anti-HKID-1  
15 antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized HKID-1. If desired, the antibody molecules directed against HKID-1 can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well-known techniques, such as protein A chromatography to obtain the IgG fraction. At  
20 an appropriate time after immunization, e.g., when the anti-HKID-1 antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, the human B cell hybridoma technique (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4:72), the EBV-  
25 hybridoma technique (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) or trioma techniques. The technology for producing hybridomas is well known (see generally *Current Protocols in Immunology* (1994) Coligan et al. (eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY). Briefly, an  
30 immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with an HKID-1 immunogen as described

WO 03/029434

PCT/US02/31948

above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody that binds HKID-1.

Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating an anti-HKID-1 monoclonal antibody (see, e.g., *Current Protocols in Immunology, supra*; Galfré et al. (1977) *Nature* 266:55052; R.H. Kenneth, in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); and Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402. Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also would be useful. Typically, the immortal cell line (e.g., a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line, e.g., a myeloma cell line that is sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, e.g., the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the invention are detected by screening the hybridoma culture supernatants for antibodies that bind HKID-1, e.g., using a standard ELISA assay.

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-HKID-1 antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., an antibody phage display library) with HKID-1 to thereby isolate immunoglobulin library members that bind HKID-1. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612).

WO 03/029434

PCT/US02/31948

- Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, U.S. Patent No. 5,223,409; PCT Publication No. WO 92/18619; PCT Publication No. WO 91/17271; PCT Publication No. WO 92/20791; PCT Publication No. WO 92/15679;
- 5 PCT Publication No. WO 93/01288; PCT Publication No. WO 92/01047; PCT Publication No. WO 92/09690; PCT Publication No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734.
- 10 Additionally, recombinant anti-HKID-1 antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using
- 15 methods described in PCT Publication No. WO 87/02671; European Patent Application 184,187; European Patent Application 171,496; European Patent Application 173,494; PCT Publication No. WO 86/01533; U.S. Patent No. 4,816,567; European Patent Application 125,023; Better et al. (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al. (1987) *J.*
- 20 *Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al. (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi et al. (1986) *Bio/Techniques* 4:214; U.S. Patent 5,225,539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534;
- 25 and Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.
- Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Such antibodies can be produced using transgenic mice which are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chains genes, but which can express human heavy and light chain genes. The
- 30 transgenic mice are immunized in the normal fashion with a selected antigen, e.g., all or a portion of HKID-1. Monoclonal antibodies directed against the antigen can be

WO 03/029434

PCT/US02/31948

obtained using conventional hybridoma technology. The human immunoglobulin transgenes harbored by the transgenic mice rearrange during B cell differentiation, and subsequently undergo class switching and somatic mutation. Thus, using such a technique, it is possible to produce therapeutically useful IgG, IgA and IgE antibodies.

5 For an overview of this technology for producing human antibodies, see Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). For a detailed discussion of this technology for producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, see, e.g., U.S. Patent 5,625,126; U.S. Patent 5,633,425; U.S. Patent 5,569,825; U.S. Patent 5,661,016; and U.S. Patent 5,545,806.

10 In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Freemont, CA), can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, e.g., a murine antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope.

15

First, a non-human monoclonal antibody which binds a selected antigen (epitope), e.g., an antibody which inhibits HKID-1 activity, is identified. The heavy chain and the light chain of the non-human antibody are cloned and used to create phage display Fab fragments. For example, the heavy chain gene can be cloned into a plasmid vector so that the heavy chain can be secreted from bacteria. The light chain gene can be cloned into a phage coat protein gene so that the light chain can be expressed on the surface of phage. A repertoire (random collection) of human light chains fused to phage is used to infect the bacteria which express the non-human heavy chain. The resulting progeny phage display hybrid antibodies (human light chain/non-human heavy chain). The selected antigen is used in a panning screen to select phage which bind the selected antigen. Several rounds of selection may be required to identify such phage. Next, human light chain genes are isolated from the selected phage which bind the selected antigen. These selected human light chain genes are then used to guide the selection of human heavy chain genes as follows. The selected human light chain genes are inserted into vectors for expression by

20

25

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

bacteria. Bacteria expressing the selected human light chains are infected with a repertoire of human heavy chains fused to phage. The resulting progeny phage display human antibodies (human light chain/human heavy chain).

5 Next, the selected antigen is used in a panning screen to select phage which bind the selected antigen. The phage selected in this step display a completely human antibody which recognizes the same epitope recognized by the original selected, non-human monoclonal antibody. The genes encoding both the heavy and light chains are readily isolated and can be further manipulated for production of human antibody. This technology is described by Jespers et al. (1994, *Bio/technology* 12:899-903).

10 An anti-HKID-1 antibody (e.g., monoclonal antibody) can be used to isolate HKID-1 by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation. An anti-HKID-1 antibody can facilitate the purification of natural HKID-1 from cells and of recombinantly produced HKID-1 expressed in host cells. Moreover, an anti-HKID-1 antibody can be used to detect HKID-1 protein (e.g.,  
15 in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the HKID-1 protein. Anti-HKID-1 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, e.g., to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling the antibody to a detectable substance. Examples of  
20 detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable  
25 fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  or  $^3\text{H}$ .

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

#### IV. Recombinant Expression Vectors and Host Cells

The invention further provides vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding an HKID-1 protein of the present invention or a portion thereof.

As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors, expression vectors, are capable of directing the expression of genes to which they are operably linked. In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids (vectors). However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell. This means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, which is operably linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operably linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner which allows for expression of the nucleotide sequence (e.g., in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell). The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other

WO 03/029434

PCT/US02/31948

expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Regulatory sequences include those which direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cell and those which direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (e.g., tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (e.g., HKID-1 proteins, mutant forms of HKID-1, fusion proteins, etc.).

The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of HKID-1 in prokaryotic or eukaryotic cells, e.g., bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors), yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, *supra*. Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: 1) to increase expression of recombinant protein; 2) to increase the solubility of the recombinant protein; and 3) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene*

WO 03/029434

PCT/US02/31948

67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRITS (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

Examples of suitable inducible non-fusion *E. coli* expression vectors include  
5 pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) and pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). Target gene expression from the pTrc vector relies on host RNA polymerase transcription from a hybrid trp-lac fusion promoter. Target gene  
10 expression from the pET 11d vector relies on transcription from a T7 gn10-lac fusion promoter mediated by a coexpressed viral RNA polymerase (T7 gn1). This viral polymerase is supplied by host strains BL21(DE3) or HMS174(DE3) from a resident  $\lambda$  prophage harboring a T7 gn1 gene under the transcriptional control of the lacUV 5 promoter.

One strategy to maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to  
15 express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein (Gottesman, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those  
20 preferentially utilized in *E. coli* (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.

In another embodiment, the HKID-1 expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast *S. cerevisiae* include pYepSec1  
25 (Baldari et al. (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), and pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).

Alternatively, HKID-1 can be expressed in insect cells using baculovirus  
30 expression vectors. Baculovirus vectors available for expression of proteins in cultured insect cells (e.g., Sf9 cells) include the pAc series (Smith et al. (1983) *Mol.*

WO 03/029434

PCT/US02/31948

*Cell Biol.* 3:2156-2165) and the pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

In yet another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329:840) and pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, cytomegalovirus and Simian Virus 40. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells see chapters 16 and 17 of Sambrook et al., *supra*.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (e.g., tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Tissue-specific regulatory elements are known in the art. Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), lymphoid-specific promoters (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) and immunoglobulins (Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), neuron-specific promoters (e.g., the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund et al. (1985) *Science* 230:912-916), and mammary gland-specific promoters (e.g., milk whey promoter; U.S. Patent No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, for example the murine hox promoters (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) and the  $\alpha$ -fetoprotein promoter (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operably linked to a regulatory sequence in a manner which allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an

WO 03/029434

PCT/US02/31948

RNA molecule which is antisense to HKID-1 mRNA. Regulatory sequences operably linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen  
5 which direct constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation  
10 of gene expression using antisense genes see Weintraub et al. (*Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986).

Another aspect of the invention provides host cells into which a recombinant expression vector of the invention has been introduced. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such  
15 terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

20 A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, HKID-1 protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via  
25 conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (e.g., DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Suitable methods for transforming or  
30 transfecting host cells can be found in Sambrook, et al. (*supra*), and other laboratory manuals.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

For stable transfection of mammalian cells, it is known that, depending upon the expression vector and transfection technique used, only a small fraction of cells may integrate the foreign DNA into their genome. In order to identify and select these integrants, a gene that encodes a selectable marker (e.g., for resistance to antibiotics) is generally introduced into the host cells along with the gene of interest. Selectable markers include those which confer resistance to drugs, such as G418, hygromycin and methotrexate. Nucleic acid encoding a selectable marker can be introduced into a host cell on the same vector as that encoding HKID-1 or can be introduced on a separate vector. Cells stably transfected with the introduced nucleic acid can be identified by drug selection (e.g., cells that have incorporated the selectable marker gene will survive, while the other cells die).

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (i.e., express) HKID-1 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing HKID-1 protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of invention (into which a recombinant expression vector encoding HKID-1 has been introduced) in a suitable medium such that HKID-1 protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating HKID-1 from the medium or the host cell.

The host cells of the invention can also be used to produce nonhuman transgenic animals. For example, in one embodiment, a host cell of the invention is a fertilized oocyte or an embryonic stem cell into which HKID-1-coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals in which exogenous HKID-1 sequences have been introduced into their genome or homologous recombinant animals in which endogenous HKID-1 sequences have been altered. Such animals are useful for studying the function and/or activity of HKID-1 and for identifying and/or evaluating modulators of HKID-1 activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, etc. A transgene is

WO 03/029434

PCT/US02/31948

exogenous DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops and which remains in the genome of the mature animal, thereby directing the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal. As used herein, an "homologous recombinant animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a mouse, in which an endogenous HKID-1 gene has been altered by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a cell of the animal, e.g., an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal.

10 A transgenic animal of the invention can be created by introducing HKID-1-encoding nucleic acid into the male pronuclei of a fertilized oocyte, e.g., by microinjection, retroviral infection, and allowing the oocyte to develop in a pseudopregnant female foster animal. The HKID-1 cDNA sequence (e.g., that of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3) can be introduced as a transgene into the genome of a non-  
15 human animal. Alternatively, a nonhuman homolog of the human HKID-1 gene, such as a mouse HKID-1 gene, can be isolated based on hybridization to the human HKID-1 cDNA and used as a transgene. Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operably linked to the  
20 HKID-1 transgene to direct expression of HKID-1 protein to particular cells. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009, U.S. Patent No. 4,873,191 and in Hogan, *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor  
25 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Similar methods are used for production of other transgenic animals. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of the HKID-1 transgene in its genome and/or expression of HKID-1 mRNA in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic  
30 animals carrying a transgene encoding HKID-1 can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

To create an homologous recombinant animal, a vector is prepared which contains at least a portion of an HKID-1 gene (e.g., a human or a non-human homolog of the HKID-1 gene, e.g., a murine HKID-1 gene) into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, e.g., functionally disrupt, the HKID-1 gene. In an embodiment, the vector is designed such that, upon homologous recombination, the endogenous HKID-1 gene is functionally disrupted (i.e., no longer encodes a functional protein; also referred to as a "knock out" vector). Alternatively, the vector can be designed such that, upon homologous recombination, the endogenous HKID-1 gene is mutated or otherwise altered but still encodes functional protein (e.g., the upstream regulatory region can be altered to thereby alter the expression of the endogenous HKID-1 protein). In the homologous recombination vector, the altered portion of the HKID-1 gene is flanked at its 5' and 3' ends by additional nucleic acid of the HKID-1 gene to allow for homologous recombination to occur between the exogenous HKID-1 gene carried by the vector and an endogenous HKID-1 gene in an embryonic stem cell. The additional flanking HKID-1 nucleic acid is of sufficient length for successful homologous recombination with the endogenous gene. Typically, several kilobases of flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector (see, e.g., Thomas and Capecchi (1987) *Cell* 51:503 for a description of homologous recombination vectors). The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced HKID-1 gene has homologously recombined with the endogenous HKID-1 gene are selected (see, e.g., Li et al. (1992) *Cell* 69:915). The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse) to form aggregation chimeras (see, e.g., Bradley in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152). A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA by germline transmission of the transgene. Methods for constructing homologous recombination vectors and homologous recombinant animals are described further in Bradley (1991) *Current Opinion in BioTechnology*

WO 03/029434

PCT/US02/31948

2:823-829 and in PCT Publication Nos. WO 90/11354, WO 91/01140, WO 92/0968, and WO 93/04169.

In another embodiment, transgenic non-human animals can be produced which contain selected systems which allow for regulated expression of the transgene. One example of such a system is the *cre/loxP* recombinase system of bacteriophage P1. For a description of the *cre/loxP* recombinase system, see, e.g., Lakso et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232-6236. Another example of a recombinase system is the FLP recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al. (1991) *Science* 251:1351-1355. If a *cre/loxP* recombinase system is used to regulate expression of the transgene, animals containing transgenes encoding both the *Cre* recombinase and a selected protein are required. Such animals can be provided through the construction of "double" transgenic animals, e.g., by mating two transgenic animals, one containing a transgene encoding a selected protein and the other containing a transgene encoding a recombinase.

Clones of the non-human transgenic animals described herein can also be produced according to the methods described in Wilmut et al. (1997) *Nature* 385:810-813 and PCT Publication Nos. WO 97/07668 and WO 97/07669. In brief, a cell, e.g., a somatic cell, from the transgenic animal can be isolated and induced to exit the growth cycle and enter G<sub>0</sub> phase. The quiescent cell can then be fused, e.g., through the use of electrical pulses, to an enucleated oocyte from an animal of the same species from which the quiescent cell is isolated. The reconstructed oocyte is then cultured such that it develops to morula or blastocyte and then transferred to pseudopregnant female foster animal. The offspring borne of this female foster animal will be a clone of the animal from which the cell, e.g., the somatic cell, is isolated.

#### V. Pharmaceutical Compositions

The HKID-1 nucleic acid molecules, HKID-1 proteins, and anti-HKID-1 antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a

WO 03/029434

PCT/US02/31948

pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (e.g., inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF; Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion

WO 03/029434

PCT/US02/31948

medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (e.g., an HKID-1 protein or anti-HKID-1 antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such

WO 03/029434

PCT/US02/31948

as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring. For administration by  
5 inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from a pressurized container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier  
10 to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally  
15 known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will  
20 protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the  
25 art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No.  
30 4,522,811.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. Depending on the type and severity of the disease, about 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to 15  $\text{mg}/\text{kg}$  (e.g., 0.1 to 20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to 100  $\text{mg}/\text{kg}$  or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays. An exemplary dosing regimen is disclosed in WO 94/04188. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (U.S. Patent 5,328,470) or by stereotactic injection (see, e.g., Chen et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, e.g. retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells which produce the gene delivery system.

The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

#### VI. Uses and Methods of the Invention

The nucleic acid molecules, proteins, protein homologs, and antibodies described herein can be used in one or more of the following methods: a) screening assays; b) detection assays (e.g., chromosomal mapping, tissue typing, forensic biology); c) predictive medicine (e.g., diagnostic assays, prognostic assays, monitoring clinical trials, and pharmacogenomics); and d) methods of treatment (e.g., therapeutic and prophylactic). An HKID-1 protein interacts with other cellular proteins and can thus be used as a target for developing therapeutic molecules for modulating HKID-1 protein in cells expressing HKID-1 protein or cells involved in the HKID-1 pathway, e.g., cells of the nervous system. The isolated nucleic acid molecules of the invention can be used to express HKID-1 protein (e.g., via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to detect HKID-1 mRNA (e.g., in a biological sample) or a genetic lesion in an HKID-1 gene, and to modulate HKID-1 activity. In addition, the HKID-1 proteins can be used to screen drugs or compounds which modulate the HKID-1 activity or expression as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of HKID-1 protein or production of HKID-1 protein forms which have decreased or aberrant activity compared to HKID-1 wild type protein. In addition, the anti-HKID-1 antibodies of the invention can be used to detect and isolate HKID-1 proteins and modulate HKID-1 activity.

This invention further provides novel agents identified by the above-described screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

#### A. Screening Assays

The invention provides a method (also referred to herein as a "screening assay") for identifying modulators, i.e., candidate or test compounds or agents (e.g., peptides, peptidomimetics, small molecules or other drugs) which bind to HKID-1 proteins or have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, HKID-1 expression or HKID-1 activity.

In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which bind to or modulate the activity of an HKID-1 protein or

WO 03/029434

PCT/US02/31948

polypeptide or biologically active portion thereof. The test compounds of the present invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound" library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Libraries of compounds may be presented in solution (e.g., Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-421), or on beads (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (U.S. Patent No. 5,223,409), spores (Patent Nos. 5,571,698; 5,403,484; and 5,223,409), plasmids (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) or phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; and Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310).

In an embodiment, an assay of the present invention is a cell-free assay comprising contacting an HKID-1 protein or biologically active portion thereof with a test compound and determining the ability of the test compound to bind to the HKID-1 protein or biologically active portion thereof. Binding of the test compound to the HKID-1 protein can be determined either directly or indirectly as described above. In an embodiment, the assay includes contacting the HKID-1 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds HKID-1 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with an HKID-1 protein, wherein determining

WO 03/029434

PCT/US02/31948

the ability of the test compound to interact with an HKID-1 protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to HKID-1 or biologically active portion thereof as compared to the known compound.

In another embodiment, an assay is a cell-free assay comprising contacting  
5 HKID-1 protein or biologically active portion thereof with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (e.g., stimulate or inhibit) the activity of the HKID-1 protein or biologically active portion thereof. Determining  
10 the ability of the test compound to modulate the activity of HKID-1 can be accomplished, for example, by determining the ability of the HKID-1 protein to bind to an HKID-1 target molecule by one of the methods described above for determining  
15 direct binding. In an alternative embodiment, determining the ability of the test compound to modulate the activity of HKID-1 can be accomplished by determining the ability of the HKID-1 protein to further modulate an HKID-1 target molecule. For example, the catalytic/enzymatic activity of the target molecule on an appropriate  
substrate can be determined as previously described.

In yet another embodiment, the cell-free assay comprises contacting the HKID-1 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds HKID-1 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with an HKID-1 protein,  
20 wherein determining the ability of the test compound to interact with an HKID-1 protein comprises determining the ability of the HKID-1 protein to preferentially bind to or modulate the activity of an HKID-1 target molecule.

Phosphoaminoacid analysis of the phosphorylated substrate can also be performed in order to determine which residues on the HKID-1 substrate are  
25 phosphorylated. Briefly, the radiophosphorylated protein band can be excised from the SDS gel and subjected to partial acid hydrolysis. The products can then be separated by one-dimensional electrophoresis and analyzed on, for example, a phosphoimager and compared to ninhydrin-stained phosphoaminoacid standards.

In yet another embodiment of the invention, the cell free assay determines the  
30 ability of the HKID-1 protein to phosphorylate an HKID-1 target molecule by, for example, an *in vitro* kinase assay. Briefly, an HKID-1 target molecule, e.g., an

WO 03/029434

PCT/US02/31948

immunoprecipitated HKID-1 target molecule from a cell line expressing such a molecule, can be incubated with the HKID-1 protein and radioactive ATP, e.g., [gamma-<sup>32</sup>P] ATP, in a buffer containing MgCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub>, e.g., 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM MnCl<sub>2</sub>. Following the incubation, the immunoprecipitated HKID-1 target molecule can be separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, transferred to a membrane, e.g., a PVDF membrane, and autoradiographed. The appearance of detectable bands on the autoradiograph indicates that the HKID-1 substrate has been phosphorylated.

In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a soluble form of HKID-1 protein, or a biologically active portion thereof, is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to an HKID-1 protein determined. The cell, for example, can be a yeast cell or a cell of mammalian origin. Determining the ability of the test compound to bind to the HKID-1 protein can be accomplished, for example, by coupling the test compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the test compound to the HKID-1 protein or biologically active portion thereof can be determined by detecting the labeled compound in a complex. For example, test compounds can be labeled with <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, or <sup>3</sup>H, either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, test compounds can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product. In an embodiment, the assay comprises contacting a cell which expresses a soluble form of HKID-1 protein, or a biologically active portion thereof, on the cell surface with a known compound which binds HKID-1 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with an HKID-1 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with an HKID-1 protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to HKID-1 or a biologically active portion thereof as compared to the known compound.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

In another embodiment, an assay is a cell-based assay comprising contacting a cell expressing a soluble form of HKID-1 protein, or a biologically active portion thereof, with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (e.g., stimulate or inhibit) the activity of the HKID-1 protein or biologically active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of HKID-1 or a biologically active portion thereof can be accomplished, for example, by determining the ability of the HKID-1 protein to bind to or interact with an HKID-1 target molecule. As used herein, a "target molecule" is a molecule with which an HKID-1 protein binds or interacts in nature, for example, a substrate molecule phosphorylated by HKID-1 protein in the interior of a cell which expresses an HKID-1 protein, a molecule associated with the internal surface of a cell membrane or a cytoplasmic molecule. An HKID-1 target molecule can be a non-HKID-1 molecule or an HKID-1 protein or polypeptide of the present invention. In one embodiment, an HKID-1 target molecule is a component of a signal transduction pathway which mediates transduction of a signal.

Determining the ability of the HKID-1 protein to bind to or interact with an HKID-1 target molecule can be accomplished by one of the methods described above for determining direct binding. In an embodiment, determining the ability of the HKID-1 protein to bind to or interact with an HKID-1 target molecule can be accomplished by determining the activity of the target molecule. For example, the activity of the target molecule can be determined by detecting induction of a cellular second messenger of the target (e.g., intracellular  $Ca^{2+}$ , diacylglycerol, IP3, etc.), detecting catalytic/enzymatic activity of the target on an appropriate substrate, detecting the induction of a reporter gene (e.g., an HKID-1-responsive regulatory element operably linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, e.g. luciferase), or detecting a cellular response, for example, cellular differentiation, or cell proliferation.

In various formats of the assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize either HKID-1 or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to HKID-1, or

WO 03/029434

PCT/US02/31948

interaction of HKID-1 with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtitre plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/ HKID-1 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or HKID-1 protein, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtitre plate wells are washed to remove any unbound components and complex formation is measured either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of HKID-1 binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either HKID-1 or its target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated HKID-1 or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemicals). Alternatively, antibodies reactive with HKID-1 or target molecules but which do not interfere with binding of the HKID-1 protein to its target molecule can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or HKID-1 trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the HKID-1 or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the HKID-1 or target molecule.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

In another embodiment, modulators of HKID-1 expression are identified in a method in which a cell is contacted with a candidate compound and the expression of HKID-1 mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of HKID-1 mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of HKID-1 mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be identified as a modulator of HKID-1 expression based on this comparison. For example, when expression of HKID-1 mRNA or protein is greater (statistically significantly greater) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of HKID-1 mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of HKID-1 mRNA or protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of HKID-1 mRNA or protein expression. The level of HKID-1 mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described herein for detecting HKID-1 mRNA or protein.

In yet another aspect of the invention, the HKID-1 proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Bio/Techniques* 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and PCT Publication No. WO 94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with HKID-1 ("HKID-1-binding proteins" or "HKID-1-bp") and modulate HKID-1 activity. Such HKID-1-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the HKID-1 proteins as, for example, upstream or downstream elements of the HKID-1 pathway. The invention also provides for the use of proteins that interact with HKID-1, e.g., two-hybrid interactors with HKID-1, as baits in two-hybrid screens and the identification of HKID-1 interacting protein interacting proteins. HKID-1 interacting protein interacting proteins are likely to be involved in the HKID-1 signal transduction pathway.

This invention further provides novel agents identified by the above-described screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

#### B. Detection Assays

Portions or fragments of the cDNA sequences identified herein (and the corresponding complete gene sequences) can be used in numerous ways as polynucleotide reagents. For example, these sequences can be used to: (i) map their respective genes on a chromosome and, thus, locate gene regions associated with genetic disease; (ii) identify an individual from a minute biological sample (tissue typing); and (iii) aid in forensic identification of a biological sample. These applications are described in the subsections below.

10

##### 1. Tissue Typing

The HKID-1 sequences of the present invention can also be used to identify individuals from minute biological samples. The United States military, for example, is considering the use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for identification of its personnel. In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, and probed on a Southern blot to yield unique bands for identification. This method does not suffer from the current limitations of "Dog Tags" which can be lost, switched, or stolen, making positive identification difficult. The sequences of the present invention are useful as additional DNA markers for RFLP (described in U.S. Patent 5,272,057).

20

Furthermore, the sequences of the present invention can be used to provide an alternative technique which determines the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. Thus, the HKID-1 sequences described herein can be used to prepare two PCR primers from the 5' and 3' ends of the sequences. These primers can then be used to amplify an individual's DNA and subsequently sequence it.

25

Panels of corresponding DNA sequences from individuals, prepared in this manner, can provide unique individual identifications, as each individual will have a unique set of such DNA sequences due to allelic differences. The sequences of the present invention can be used to obtain such identification sequences from individuals and from tissue. The HKID-1 sequences of the invention uniquely represent portions

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

of the human genome. Allelic variation occurs to some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the noncoding regions. It is estimated that allelic variation between individual humans occurs with a frequency of about once per each 500 bases. Each of the sequences described herein can, to some degree, be used as a standard against which DNA from an individual can be compared for identification purposes. Because greater numbers of polymorphisms occur in the noncoding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. The noncoding sequences of SEQ ID NO:1 can comfortably provide positive individual identification with a panel of perhaps 10 to 1,000 primers which each yield a noncoding amplified sequence of 100 bases. If predicted coding sequences, such as those in SEQ ID NO:3 are used, a more appropriate number of primers for positive individual identification would be 500-2,000.

If a panel of reagents from HKID-1 sequences described herein is used to generate a unique identification database for an individual, those same reagents can later be used to identify tissue from that individual. Using the unique identification database, positive identification of the individual, living or dead, can be made from extremely small tissue samples.

## 2. Use of Partial HKID-1 Sequences in Forensic Biology

DNA-based identification techniques can also be used in forensic biology. Forensic biology is a scientific field employing genetic typing of biological evidence found at a crime scene as a means for positively identifying, for example, a perpetrator of a crime. To make such an identification, PCR technology can be used to amplify DNA sequences taken from very small biological samples such as tissues, e.g., hair or skin, or body fluids, e.g., blood, saliva, or semen found at a crime scene. The amplified sequence can then be compared to a standard, thereby allowing identification of the origin of the biological sample.

The sequences of the present invention can be used to provide polynucleotide reagents, e.g., PCR primers, targeted to specific loci in the human genome, which can enhance the reliability of DNA-based forensic identifications by, for example, providing another "identification marker" (i.e. another DNA sequence that is unique to

WO 03/029434

PCT/US02/31948

a particular individual). As mentioned above, actual base sequence information can be used for identification as an accurate alternative to patterns formed by restriction enzyme generated fragments. Sequences targeted to noncoding regions of SEQ ID NO:1 are particularly appropriate for this use as greater numbers of polymorphisms occur in the noncoding regions, making it easier to differentiate individuals using this technique. Examples of polynucleotide reagents include the HKID-1 sequences or portions thereof, e.g., fragments derived from the noncoding regions of SEQ ID NO:1 having a length of at least 20 or 30 bases.

The HKID-1 sequences described herein can further be used to provide polynucleotide reagents, e.g., labeled or labelable probes which can be used in, for example, an *in situ* hybridization technique, to identify a specific tissue, e.g., brain tissue. This can be very useful in cases where a forensic pathologist is presented with a tissue of unknown origin. Panels of such HKID-1 probes can be used to identify tissue by species and/or by organ type.

In a similar fashion, these reagents, e.g., HKID-1 primers or probes can be used to screen tissue culture for contamination (i.e., screen for the presence of a mixture of different types of cells in a culture).

#### C. Predictive Medicine

The present invention also provides the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, pharmacogenomics, and monitoring clinical trails are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual prophylactically. Accordingly, one aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining HKID-1 protein and/or nucleic acid expression as well as HKID-1 activity, in the context of a biological sample (e.g., blood, serum, cells, tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a disease or disorder, or is at risk of developing a disorder, associated with aberrant HKID-1 expression or activity. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a disorder associated with HKID-1 protein, nucleic acid expression or activity. For example, mutations in an HKID-1 gene can be assayed in a biological sample. Such assays can

WO 03/029434

PCT/US02/31948

be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior to the onset of a disorder characterized by or associated with HKID-1 protein, nucleic acid expression or activity.

Another aspect of the invention provides methods for determining HKID-1 protein, nucleic acid expression or HKID-1 activity in an individual to thereby select appropriate therapeutic or prophylactic agents for that individual (referred to herein as "pharmacogenomics"). Pharmacogenomics allows for the selection of agents (e.g., drugs) for therapeutic or prophylactic treatment of an individual based on the genotype of the individual (e.g., the genotype of the individual examined to determine the ability of the individual to respond to a particular agent.)

Yet another aspect of the invention provides monitoring the influence of agents (e.g., drugs or other compounds) on the expression or activity of HKID-1 in clinical trials.

These and other agents are described in further detail in the following sections.

15

#### 1. Diagnostic Assays

An exemplary method for detecting the presence or absence of HKID-1 in a biological sample involves obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting HKID-1 protein or nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) that encodes HKID-1 protein such that the presence of HKID-1 is detected in the biological sample. An agent for detecting HKID-1 mRNA or genomic DNA can be a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to HKID-1 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, a full-length HKID-1 nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO: 1 or 3, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to HKID-1 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

An agent for detecting HKID-1 protein can be an antibody capable of binding to HKID-1 protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

(e.g., Fab or F(ab')<sub>2</sub>) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin. The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject.

10 That is, the detection method of the invention can be used to detect HKID-1 mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of HKID-1 mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of HKID-1 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of HKID-1 genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of HKID-1 protein include introducing into a subject a labeled anti-HKID-1 antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by

20 standard imaging techniques.

In one embodiment, the biological sample contains protein molecules from the test subject. Alternatively, the biological sample can contain mRNA molecules from the test subject or genomic DNA molecules from the test subject. A biological sample is a peripheral blood leukocyte sample isolated by conventional means from a

25 subject.

In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting HKID-1 protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of HKID-1 protein, mRNA or genomic DNA is detected in the

30 biological sample, and comparing the presence of HKID-1 protein, mRNA or genomic

WO 03/029434

PCT/US02/31948

DNA in the control sample with the presence of HKID-1 protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

The invention also encompasses kits for detecting the presence of HKID-1 in a biological sample (a test sample). Such kits can be used to determine if a subject is suffering from or is at increased risk of developing a disorder associated with aberrant expression of HKID-1 (e.g., an immunological disorder). For example, the kit can comprise a labeled compound or agent capable of detecting HKID-1 protein or mRNA in a biological sample and means for determining the amount of HKID-1 in the sample (e.g., an anti-HKID-1 antibody or an oligonucleotide probe which binds to DNA encoding HKID-1, e.g., SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3). Kits can also include instructions for observing that the tested subject is suffering from or is at risk of developing a disorder associated with aberrant expression of HKID-1 if the amount of HKID-1 protein or mRNA is above or below a normal level.

For antibody-based kits, the kit can comprise, for example: (1) a first antibody (e.g., attached to a solid support) which binds to HKID-1 protein; and, optionally, (2) a second, different antibody which binds to HKID-1 protein or the first antibody and is conjugated to a detectable agent.

For oligonucleotide-based kits, the kit can comprise, for example: (1) an oligonucleotide, e.g., a detectably labeled oligonucleotide, which hybridizes to an HKID-1 nucleic acid sequence or (2) a pair of primers useful for amplifying an HKID-1 nucleic acid molecule;

The kit can also comprise, e.g., a buffering agent, a preservative, or a protein stabilizing agent. The kit can also comprise components necessary for detecting the detectable agent (e.g., an enzyme or a substrate). The kit can also contain a control sample or a series of control samples which can be assayed and compared to the test sample contained. Each component of the kit is usually enclosed within an individual container and all of the various containers are within a single package along with instructions for observing whether the tested subject is suffering from or is at risk of developing a disorder associated with aberrant expression of HKID-1.

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

## 2. Prognostic Assays

The methods described herein can furthermore be utilized as diagnostic or prognostic assays to identify subjects having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant HKID-1 expression or activity. For example, the assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be utilized to identify a subject having or at risk of developing a disorder associated with HKID-1 protein, nucleic acid expression or activity. Alternatively, the prognostic assays can be utilized to identify a subject having or at risk for developing such a disease or disorder. Thus, the present invention provides a method in which a test sample is obtained from a subject and HKID-1 protein or nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) is detected, wherein the presence of HKID-1 protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant HKID-1 expression or activity. As used herein, a "test sample" refers to a biological sample obtained from a subject of interest. For example, a test sample can be a biological fluid (e.g., serum), cell sample, or tissue.

Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered an agent (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate) to treat a disease or disorder associated with aberrant HKID-1 expression or activity. For example, such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with a specific agent or class of agents (e.g., agents of a type which decrease HKID-1 activity). Thus, the present invention provides methods for determining whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder associated with aberrant HKID-1 expression or activity in which a test sample is obtained and HKID-1 protein or nucleic acid is detected (e.g., wherein the presence of HKID-1 protein or nucleic acid is diagnostic for a subject that can be administered the agent to treat a disorder associated with aberrant HKID-1 expression or activity).

The methods of the invention can also be used to detect genetic lesions or mutations in an HKID-1 gene, thereby determining if a subject with the lesioned gene is at risk for a disorder characterized by aberrant cell proliferation and/or differentiation. In embodiments, the methods include detecting, in a sample of cells

WO 03/029434

PCT/US02/31948

from the subject, the presence or absence of a genetic lesion or mutation characterized by at least one of an alteration affecting the integrity of a gene encoding an HKID-1-protein, or the mis-expression of the HKID-1 gene. For example, such genetic lesions or mutations can be detected by ascertaining the existence of at least one of: 1) a deletion of one or more nucleotides from an HKID-1 gene; 2) an addition of one or more nucleotides to an HKID-1 gene; 3) a substitution of one or more nucleotides of an HKID-1 gene; 4) a chromosomal rearrangement of an HKID-1 gene; 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of an HKID-1 gene; 6) an aberrant modification of an HKID-1 gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA; 7) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of an HKID-1 gene; 8) a non-wild type level of an HKID-1-protein; 9) an allelic loss of an HKID-1 gene; and 10) an inappropriate post-translational modification of an HKID-1-protein. As described herein, there are a large number of assay techniques known in the art which can be used for detecting lesions in an HKID-1 gene. A biological sample is a peripheral blood leukocyte sample isolated by conventional means from a subject.

In certain embodiments, detection of the lesion involves the use of a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (*see, e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (*see, e.g.*, Landegran et al. (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the HKID-1-gene (*see, e.g.*, Abravaya et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). This method can include the steps of collecting a sample of cells from a patient, isolating nucleic acid (e.g., genomic, mRNA or both) from the cells of the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to an HKID-1 gene under conditions such that hybridization and amplification of the HKID-1-gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a

WO 03/029434

PCT/US02/31948

preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional  
5 amplification system (Kwoh, et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177),  
Q-Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are  
10 present in very low numbers.

In an alternative embodiment, mutations in an HKID-1 gene from a sample cell can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by  
15 gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

20 In other embodiments, genetic mutations in HKID-1 can be identified by hybridizing a sample and control nucleic acids, e.g., DNA or RNA, to high density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotides probes (Cronin et al. (1996) *Human Mutation* 7:244-255; Kozal et al. (1996) *Nature Medicine* 2:753-759). For example, genetic mutations in HKID-1 can be identified in two-dimensional  
25 arrays containing light-generated DNA probes as described in Cronin et al., *supra*. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization  
30 array that allows the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each

WO 03/029434

PCT/US02/31948

mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the HKID-1 gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample HKID-1 with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxim and Gilbert ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560) or Sanger ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays ((1995) *Bio/Techniques* 19:448), including sequencing by mass spectrometry (*see, e.g.*, PCT Publication No. WO 94/16101; Cohen et al. (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; and Griffin et al. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

Other methods for detecting mutations in the HKID-1 gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers et al. (1985) *Science* 230:1242). In general, the technique of "mismatch cleavage" entails providing heteroduplexes formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type HKID-1 sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent which cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to basepair mismatches between the control and sample strands. RNA/DNA duplexes can be treated with RNase to digest mismatched regions, and DNA/DNA hybrids can be treated with S1 nuclease to digest mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. *See, e.g.*, Cotton et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba et al. (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. In an embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in HKID-1 cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu et al. (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). According to an exemplary embodiment, a probe based on an HKID-1 sequence, e.g., a wild-type HKID-1 sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, e.g., U.S. Patent No. 5,459,039.

In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in HKID-1 genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766; see also Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control HKID-1 nucleic acids will be denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, and the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments may be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In an embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7:5).

In yet another embodiment, the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers et al. (1985) *Nature* 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp

WO 03/029434

PCT/US02/31948

of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:12753).

5 Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions which permit hybridization only if a perfect match is found (Saiki et al. (1986) *Nature* 324:163); Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230).  
10 Such allele specific oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different mutations when the oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

Alternatively, allele specific amplification technology which depends on  
15 selective PCR amplification may be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (Gibbs et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent or  
20 reduce polymerase extension (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). In addition, it may be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189). In  
25 such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody  
30 reagent described herein, which may be conveniently used, e.g., in clinical settings to

WO 03/029434

PCT/US02/31948

diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving an HKID-1 gene.

Furthermore, any cell type or tissue, preferably peripheral blood leukocytes, in which HKID-1 is expressed may be utilized in the prognostic assays described herein.

5

### 3. Pharmacogenomics

Agents, or modulators which have a stimulatory or inhibitory effect on HKID-1 activity (e.g., HKID-1 gene expression) as identified by a screening assay described herein can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) disorders (e.g., disorders involving cells or tissues in which HKID-1 is expressed, such as cells of the nervous system) associated with aberrant HKID-1 activity. In conjunction with such treatment, the pharmacogenomics (i.e., the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a foreign compound or drug) of the individual may be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, the pharmacogenomics of the individual permits the selection of effective agents (e.g., drugs) for prophylactic or therapeutic treatments based on a consideration of the individual's genotype. Such pharmacogenomics can further be used to determine appropriate dosages and therapeutic regimens. Accordingly, the activity of HKID-1 protein, expression of HKID-1 nucleic acid, or mutation content of HKID-1 genes in an individual can be determined to thereby select appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment of the individual.

Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. *See, e.g., Linder (1997) Clin. Chem. 43(2):254-266.* In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body are referred to as "altered drug action." Genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs are referred to as "altered drug metabolism". These pharmacogenetic conditions can occur either as rare defects or as polymorphisms. For example,

25  
30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

5 As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (e.g., N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show  
10 exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead  
15 to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, a PM will show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. The other extreme are the so  
20 called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

Thus, the activity of HKID-1 protein, expression of HKID-1 nucleic acid, or mutation content of HKID-1 genes in an individual can be determined to thereby  
25 select appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment of the individual. In addition, pharmacogenetic studies can be used to apply genotyping of polymorphic alleles encoding drug-metabolizing enzymes to the identification of an individual's drug responsiveness phenotype. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance  
30 therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with an HKID-1

WO 03/029434

PCT/US02/31948

modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.

#### 4. Monitoring of Effects During Clinical Trials

5 Monitoring the influence of agents (e.g., drugs, compounds) on the expression or activity of HKID-1 (e.g., the ability to modulate aberrant cell proliferation and/or differentiation) can be applied not only in basic drug screening, but also in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent, as determined by a screening assay as described herein, to increase HKID-1 gene expression, protein levels or protein  
10 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased HKID-1 gene expression, protein levels, or protein activity. Alternatively, the effectiveness of an agent, as determined by a screening assay, to decrease HKID-1 gene expression, protein levels or protein activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased HKID-1 gene expression, protein levels, or protein activity. In  
15 such clinical trials, HKID-1 expression or activity and preferably, that of other genes that have been implicated in for example, a cellular proliferation disorder, can be used as a marker of the immune responsiveness of a particular cell.

For example, and not by way of limitation, genes, including HKID-1, that are modulated in cells by treatment with an agent (e.g., compound, drug or small  
20 molecule) which modulates HKID-1 activity (e.g., as identified in a screening assay described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents on cellular proliferation disorders, for example, in a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of HKID-1 and other genes implicated in the disorder. The levels of gene expression (i.e., a gene expression  
25 pattern) can be quantified by Northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, by hybridization to a multiple tissue expression array as described in Example 2, or alternatively by measuring the amount of protein produced, by one of the methods as described herein, or by measuring the levels of activity of HKID-1 or other genes. In  
30 this way, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent. Accordingly, this response state may

WO 03/029434

PCT/US02/31948

be determined before, and at various points during, treatment of the individual with the agent.

In an embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate identified by the screening assays described herein) comprising the steps of (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of an HKID-1 protein, mRNA, or genomic DNA in the preadministration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the HKID-1 protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the HKID-1 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the HKID-1 protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of HKID-1 to higher levels than detected, i.e., to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of HKID-1 to lower levels than detected, i.e., to decrease the effectiveness of the agent.

#### D. Methods of Treatment

The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant HKID-1 expression or activity.

##### 1. Prophylactic Methods

In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a disease or condition associated with an aberrant HKID-1 expression or activity, by administering to the subject an agent which modulates HKID-1 expression or at least one HKID-1 activity. Subjects at risk for a disease which is caused or contributed to

WO 03/029434

PCT/US02/31948

by aberrant HKID-1 expression or activity can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the HKID-1 aberrancy, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of HKID-1 aberrancy, for example, an HKID-1 agonist or HKID-1 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

## 2. Therapeutic Methods

Another aspect of the invention provides methods of modulating HKID-1 expression or activity for therapeutic purposes. The modulatory method of the invention involves contacting a cell with an agent that modulates one or more of the activities of HKID-1 protein activity associated with the cell. An agent that modulates HKID-1 protein activity can be an agent as described herein, such as a small molecule, e.g., a small molecule that modulates the protein kinase activity of HKID-1, a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring cognate ligand of an HKID-1 protein, a peptide, or an HKID-1 peptidomimetic. In one embodiment, the agent stimulates one or more of the biological activities of HKID-1 protein. Examples of such stimulatory agents include small molecules that stimulate one or more activities of HKID-1, e.g., the HKID-1 protein kinase activity, active HKID-1 protein and a nucleic acid molecule encoding HKID-1 that has been introduced into the cell. In another embodiment, the agent inhibits one or more of the biological activities of HKID-1 protein. Examples of such inhibitory agents include a small molecule that inhibits one or more HKID-1 activity, e.g., HKID-1 protein kinase activity, antisense HKID-1 nucleic acid molecules and anti-HKID-1 antibodies. These modulatory methods can be performed *in vitro* (e.g., by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (e.g., by administering the agent to a subject). As such, the present invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant expression or activity of an HKID-1 protein or nucleic acid molecule. The present invention also provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder that can be treated by modulating the activity of

WO 03/029434

PCT/US02/31948

HKID-1 an HKID-1 protein or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves administering an agent, e.g., a small molecule, (e.g., an agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (e.g., upregulates or downregulates) HKID-1 expression or activity.

5 Stimulation of HKID-1 activity is desirable in situations in which HKID-1 is abnormally downregulated and/or in which increased HKID-1 activity is likely to have a beneficial effect. Conversely, inhibition of HKID-1 activity is desirable in situations in which HKID-1 is abnormally upregulated and/or in which decreased HKID-1 activity is likely to have a beneficial effect.

10 This invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application are hereby incorporated by reference.

15

## EXAMPLES

Example 1: Determination of the Nucleotide Sequence of HKID-1

Human HKID-1 cDNAs isolated from cDNA libraries constructed in standard cloning vectors were sequenced. The cDNA sequences were assembled into a contig and the HKID-1 sequence was determined from the consensus sequence of this contig. Analysis of the contig revealed an approximately 2126 kb HKID-1 cDNA sequence with a 978 base pair open reading frame predicted to encode a novel 326 amino acid protein. The human HKID-1 sequence (Figure 1A; SEQ ID NO:1), which is approximately 2126 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence (about 981 nucleotides including the stop codon, i.e., nucleotides 171 to 1151 of SEQ ID NO:1; nucleotides 1 to 981 of SEQ ID NO:3). The coding sequence encodes a 326 amino acid protein (SEQ ID NO:1).

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Example 2: Distribution of HKID-1 mRNA in Human Tissues

HKID-1 mRNA expression was analyzed by hybridizing a radioactively labeled HKID-1-specific DNA probe to human poly A+ RNA arrayed on a nylon membrane (the Human Multiple Tissue Expression (MTE) Array, Clontech; Palo Alto, CA). Poly A+ RNAs from the following human tissues and cell lines are present on the MTE Array: whole brain, cerebral cortex, frontal lobe, parietal lobe, occipital lobe, temporal lobe, paracentral gyrus of cerebral cortex, pons, left cerebellum, right cerebellum, corpus callosum, amygdala, caudate nucleus, hippocampus, medulla oblongata, putamen, substantia nigra, accumbens nucleus, thalamus, pituitary gland, spinal cord, heart, aorta, left atrium, right atrium, left ventricle, right ventricle, interventricular septum, apex of the heart, esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, ileocecum, appendix, ascending colon, transverse colon, descending colon, rectum, kidney, skeletal muscle, spleen, thymus, peripheral blood leukocyte, lymph node, bone marrow, trachea, lung, placenta, bladder, uterus, prostate, testis, ovary, liver, pancreas, adrenal gland, thyroid gland, salivary gland, mammary gland, HL-60 leukemia cell line, S3 HeLa cell line, K-562 leukemia cell line, MOLT-4 leukemia cell line, Raji Burkitt's lymphoma cell line, Daudi Burkitt's lymphoma cell line, SW480 colorectal adeno-carcinoma cell line, A549 lung carcinoma cell line, fetal brain, fetal heart, fetal kidney, fetal liver, fetal spleen, fetal thymus, fetal lung.

To perform the expression analysis, a portion of the HKID-1 cDNA was synthesized using PCR for use as a hybridization probe. The HKID-1 specific DNA was radioactively labeled with <sup>32</sup>P-dCTP using the Prime-It kit (Stratagene; La Jolla, CA) according to the instructions of the supplier. The MTE array filter was probed with the radiolabeled HKID-1 specific DNA probe in ExpressHyb hybridization solution (Clontech) and washed at high stringency according to the manufacturer's recommendations. These studies revealed that HKID-1 mRNA is expressed in all tissues contained in the MTE array. The highest expression in adult tissues was detected in placenta then trachea then lung then peripheral blood leukocytes then heart. In fetal tissues, the highest expression was detected in lung then heart then

WO 03/029434

PCT/US02/31948

kidney then spleen. Low expression of HKID-1 mRNA was detected in all tissues analyzed. HKID-1 mRNA expression was weak overall in both adult and fetal brain except in adult substantia nigra and adult pituitary gland in which HKID-1 mRNA levels were moderate.

5

Example 3: Characterization of HKID-1 Protein

In this example, the predicted amino acid sequence of human HKID-1 protein was compared to amino acid sequences of known motifs and/or domains present in proteins and to the polypeptide sequences of known proteins. Polypeptide domains and/or motifs present in HKID-1 were identified as were proteins with significant amino acid similarities to HKID-1. In addition, the molecular weight of the human HKID-1 protein was predicted.

The human HKID-1 nucleotide sequence (Figure 1; SEQ ID NO:1), identified as described above, encodes a 326 amino acid protein (Figure 1; SEQ ID NO:2). HKID-1 has a predicted MW of about 35.86 kDa, not including post-translational modifications. The HKID-1 polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 was used to query the PROSITE database of protein patterns and to query a library of Hidden Markov Models (HMMs) which can recognize common protein domains and families. The search of the PROSITE database revealed the presence of one cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (PS00004; SEQ ID NO:4) from amino acids 260-263 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:5; three protein kinase C phosphorylation sites (PS00005; SEQ ID NO:6) from amino acids 137-139, 275-277, and 279-281, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:7-9; three casein kinase II phosphorylation sites (PS00006; SEQ ID NO:10) from amino acids 202-205, 211-214, and 321-324, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:11-13; one tyrosine kinase phosphorylation site (PS00007; SEQ ID NO:14) from amino acid 33-40, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:15; seven N-myristoylation sites (PS00008; SEQ ID NO:16) from amino acids 43-48, 49-54, 57-62, 63-68, 80-85, 98-103, and 295-300 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NOS:17-23; one protein kinase ATP-binding region signature (PS00107; SEQ ID NO:24) from amino acid 46-54, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:25; one serine/threonine protein kinase active site signature (PS00108; SEQ ID NO:26)

30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

from amino acid 166-178, of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:27. PFAM analysis indicates that HKID-1 has a eukaryotic protein kinase domain. The search of the HMM database revealed the presence of one eukaryotic protein kinase domain (PF00069; SEQ ID NO:28) from amino acid 40-293, of SEQ ID NO:2; SEQ ID  
5 NO:29 with a score of 262.4 and E value of  $5.9 \times 10^{-75}$  (see Figure 2). For general information regarding PFAM identifiers, PS prefix and PF prefix motif identification numbers, refer to Sonnhammer et al. (1997) *Protein* 28:405-420 and [www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html](http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html).

The HKID-1 polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 was used to query the  
10 PROTOT database of protein sequences using the BLASTP program with the BLOSUM62 matrix and a protein word length of 3. The five most closely related proteins to HKID-1 identified by this BLASTP analysis are listed: HKID-1 was found to be 95% identical over 326 amino acids to rat KID-1 (AF086624; SEQ ID NO:37) with a score of 1646, 77% identical to *Xenopus laevis* (frog) PIM-1 (Q91822; SEQ ID  
15 NO:38) with a score of 922, similar to murine PIM-1 (P06803; SEQ ID NO:39) with a score of 873, similar to rat PIM-1 (P26794; SEQ ID NO:40) with a score of 884, and similar to human PIM-1 (P11309; SEQ ID NO:41) with a score of 883.

Figure 4 shows an alignment, carried out with the MegAlign program of the DNASTAR sequence analysis package using the J. Hein method with a PAM250  
20 residue weight table, of the HKID-1 polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and the just listed five closest HKID-1 relatives identified by BLASTP analysis. Table 1 shows both the percent polypeptide sequence similarity and the percent polypeptide sequence divergence between HKID-1 and its five closest relatives identified by BLASTP analysis as well as the percent polypeptide sequence similarity and the  
25 percent polypeptide sequence divergence between said HKID-1 relatives and each other. Sequence pair distances were carried out with the MegAlign program of the DNASTAR sequence analysis package using the J. Hein method with a PAM250 residue weight table. These analyses indicate that HKID-1 is the species ortholog of  
30 rat KID-1 (Feldman, J.D. et al. (1998). *J. Biol. Chem.* 273:16535-16543) and frog PIM-1 because HKID-1 is more closely related to these two proteins than to PIM-1 proteins. It has been reported that frog PIM-1 and rat KID-1 are species orthologs

WO 03/029434

PCT/US02/31948

(Feldman, J.D. et al. (1998). J. Biol. Chem. 273:16535-16543). HKID-1 is a paralog of human PIM-1, murine PIM-1, and rat PIM-1. HKID-1 plays some or all of the roles in human that its species orthologs, rat KID-1 and frog PIM-1, play in the species from which they originate.

5 The rat KID-1, frog PIM-1, and human and murine PIM-1 are all known to have serine/threonine protein kinase activity in *in vitro* phosphorylation assays. The high polypeptide sequence similarity between HKID-1 and rat KID-1, frog PIM-1, and human and murine PIM-1, HKID-1 demonstrates that HKID-1 is a serine/threonine protein kinase.

10 Rat KID-1 is described in Feldman, J.D. et al. (1998). J. Biol. Chem. 273:16535-16543. Rat KID-1 is induced in specific regions of the hippocampus and cortex in response to kainic acid and electroconvulsive shock suggesting that rat KID-1 is involved in neuronal function, synaptic plasticity, learning, and memory as well as kainic acid seizures and some nervous system-related diseases such as seizures and  
15 epilepsy. Because HKID-1 is the species ortholog of rat KID-1, HKID-1 is involved in some or all of the processes and diseases in which rat KID-1 is involved. In addition, the HKID-1 paralogs, the PIM-1 proteins, are proto-oncogenes. Consequently, it is possible that HKID-1 is involved in cell growth regulation, cancer, and related pathways and diseases.

20

	frog		human	murine	rat	rat	
	PIM-1	HKID-1	PIM-1	PIM-1	KID-1	PIM-1	
frog PIM-1	***	77.5	65.5	66.1	77.2	65.5	frog PIM-1
HKID-1	26.8	***	68.7	68.4	95.4	69.0	HKID-1
human PIM-1	46.0	40.5	***	93.9	68.7	97.1	human PIM-1
murine PIM-1	44.9	41.0	6.3	***	68.4	94.3	murine PIM-1
rat KID-1	27.3	4.7	40.5	41.0	***	68.7	rat KID-1
rat PIM-1	46.0	39.9	2.9	6.0	40.5	***	rat PIM-1

Table 1. Pair distances of HKID-1 and the five most closely related proteins identified in a BLASTP analysis. Percent similarity is shown in the upper triangular quadrant and percent divergence is shown in the lower triangular quadrant. Sequence

WO 03/029434

PCT/US02/31948

pair distances were carried out with the MegAlign program of the DNASTAR sequence analysis package using the J. Hein method with a PAM250 residue weight table.

5 Example 4: Preparation of HKID-1 Fusion Proteins

Recombinant HKID-1 is produced in a variety of expression systems. In one embodiment, the mature HKID-1 peptide is expressed as a recombinant glutathione-S-transferase (GST) fusion protein in *E. coli* and the fusion protein can be isolated and characterized. HKID-1 is fused to GST and this fusion protein is expressed in *E. coli* strain PEB199. Expression of the GST-HKID-1 fusion protein in PEB199 is induced with IPTG. The recombinant fusion protein is purified from crude bacterial lysates of the induced PEB199 strain by affinity chromatography on glutathione beads. Using polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the polypeptide purified from the bacterial lysates, the molecular weight of the resultant fusion polypeptide is  
10  
15 determined.

Example 5: Identification of the chromosomal location of HKID-1.

To determine the chromosomal location of HKID-1, the HKID-1 nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 was used to query, using the BLASTN program (Altschul S.F. et al, (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410.) with a word length of 12 and using the BLOSUM62 scoring matrix, a database of human nucleotide sequences originating from nucleotide molecules that have been mapped to the human genome. The WI-11798 nucleotide sequence was found to contain HKID-1 sequences establishing that WI-11798 and HKID-1 map to the same chromosomal location, chromosome 22 between the D22S1169 and D22S\_qter markers, 196.70 centiRays from the top of the  
20  
25 chromosome 22 linkage group.

Example 6: Tissue Distribution of HKID-1 mRNA by Large-Scale Tissue-Specific Library Sequencing

Standard molecular biology methods (Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY,  
30

WO 03/029434

PCT/US02/31948

1989) were used to construct cDNA libraries in plasmid vectors from multiple human tissues. Individual cDNA clones from each library were isolated and sequenced and their nucleotide sequences were input into a database. The HKID-1 nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 was used to query the tissue-specific library cDNA clone nucleotide sequence database using the BLASTN program (Altschul S.F. et al, (1990) 5 J. Mol. Biol. 215: 403-410). with a word length of 12 and using the BLOSUM62 scoring matrix. Nucleotide sequences identical to portions of the HKID-1 nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 were found in cDNA libraries originating from human skin, kidney, lung, heart, thymus, endothelial cells, prostate, uterus, lymph node, 10 neuron, placenta, T-cell, breast and muscle. This result indicates that the HKID-1 mRNA, or fragments thereof, is expressed in the listed tissues, although it is not possible to draw any conclusion about the expression level of HKID-1 mRNA in said tissues. In addition, the fact that HKID-1-identical sequences were not detected in libraries originating from other tissues does not mean that the HKID-1 mRNA is not 15 expressed in those tissues. HKID-1 nucleic acid sequences, fragments thereof, proteins encoded by these sequences, and fragments thereof as well as modulators of HKID-1 gene or protein activity may be useful for diagnosing or treating diseases that involve the tissues in which the HKID-1 mRNA is expressed.

20 Example 7: Tissue Distribution of HKID-1 mRNA

HKID-1 (i.e., "2190" or "MID 2190") was identified through several transcriptional profiling (TxP) experiments. When normal human ovarian epithelial cells (NOE) are compared with clinical ascites samples from several patients, HKID-1 was found to be upregulated in 2/2 of the ascites samples compared to the NOE. This 25 result was confirmed by subsequent quantitative PCR experiments (Table 2), using Taqman® brand quantitative PCR kit, Applied Biosystems. The quantitative PCR reactions were performed according to the kit manufacturer's instructions.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

2190.1 Expression in Ovarian Samples				
	Average 2190.1	Average Beta 2	$\delta\delta$ Ct	Relative Expression
MDA 127 N Ovarian Epithelial Cells	22.90	16.38	6.53	10.86
MDA 224 N Ovarian Epithelial Cells	21.94	16.40	5.54	21.49
MDA 124 Ovarian Ascites	20.56	15.14	5.43	23.28
MDA 126 Ovarian Ascites	21.25	16.83	4.42	46.71

Table 2. Expression of 2190 in normal ovarian cells and ovarian ascites, using Taqman® brand quantitative PCR kit, Applied Biosystems. The quantitative PCR reactions were performed according to the kit manufacturer's instructions.

5

Similarly, breast model profiling experiments, using normal Hs578Bst breast cell line compared to the transformation competent line Hs578T, displayed high expression of HKID-1 in the Hs578T line compared to Hs578Bst (Table 3). The MCF10A cell line when grown in soft agar also exhibited higher expression of HKID-

1 than when grown on plastic (Table 3).

2190.1 Expression in Breast Models Panel				
Tissue Type	Mean 2190.1	$\beta$ 2 Mean	$\delta\delta$ Ct	Expression
MCF10MS	20.68	19.32	1.36	389.6
MCF10A	19.95	19	0.94	519.4
MCF10AT.c11	21.29	19.87	1.42	373.7
MCF10AT.c13	20.91	18.91	2	250.0
MCF10AT1	20.48	19.96	0.52	695.0
MCF10AT3B	21.95	19.36	2.59	166.1
MCF10CA1a.c11	20.04	16.59	3.45	91.5
MCF10CA1a.c11 Agar	25.25	24.52	0.73	602.9
MCF10A.m25 Plastic	24.41	24.93	-0.52	1434.0
MCF10CA Agar	22.91	21.96	0.94	519.4
MCF10CA Plastic	23.96	21.09	2.88	136.3
MCF3B Agar	23.35	21.77	1.58	335.6
MCF3B Plastic	22.06	21.37	0.68	622.0
MCF10A EGF 0 hr	18.16	17.03	1.14	455.3
MCF10A EGF 0.5 hr	17.7	16.81	0.9	535.9
MCF10A EGF 1 hr	17.58	17.04	0.54	685.4
MCF10A EGF 2 hr	17.82	16.62	1.2	436.8

WO 03/029434

PCT/US02/31948

MCF10A EGF 4 hr	18.93	17.07	1.86	276.4
MCF10A EGF 8 hr	18.89	16.92	1.97	255.3
MCF10A IGF1A 0 hr	22.11	21.56	0.55	685.4
MCF10A IGF1A 0.5 hr	22.55	22.41	0.14	904.4
MCF10A IGF1A 1 hr	22.36	21.83	0.54	690.2
MCF10A IGF1A 3 hr	22.11	21.25	0.87	547.1
MCF10A IGF1A 24 hr	21.55	21.14	0.41	755.2
MCF10AT3B.cl5 Plastic	23.58	21.59	2	250.9
MCF10AT3B.cl6 Plastic	22.93	21.72	1.22	430.8
MCF10AT3B.cl3 Plastic	23.06	21.65	1.41	376.3
MCF10AT3B.cl1 Plastic	23.23	22.11	1.12	460.1
MCF10AT3B.cl4 Plastic	23.85	21.03	2.82	141.6
MCF10AT3B.cl2 Plastic	23.13	21.18	1.95	259.7
MCF10AT3B.cl5 Agar	24.02	23.65	0.37	776.5
MCF10AT3B.cl6 Agar	24.11	23.88	0.24	846.7
MCF-7	23.8	23.24	0.56	678.3
ZR-75	22.69	21.75	0.94	519.4
T47D	24.32	21.08	3.24	105.8
MDA-231	23.88	19.44	4.43	46.2
MDA-435	23.51	20.22	3.29	101.9
SkBr3	22.13	20.58	1.54	342.7
Hs578Bst	26.47	20.16	6.3	12.6
Hs578T	22.27	20.02	2.25	211.0

Table 3. Expression of various breast tissues and cell lines, monitored by quantitative PCR, as described in Table 2, above.

Importantly, HKID-1 was shown to be induced in the HEY ovarian cell line  
 5 with serum addition in a similar expression pattern as the oncogene cMyc. The  
 expression of HKID-1 was also studied in a time course experiment in HCT 116 NOC  
 Synchronized Cells (Table 4).

WO 03/029434

PCT/US02/31948

2190 Expression in HCT 116 NOC Synchronized Cells				
	Average 2190	Average B-2	DCt	Relative Expression
HCT 116 NOC t=0	22.04	21.25	0.79	578.34
HCT 116 NOC t=3	21.665	20.825	0.84	558.64
HCT 116 NOC t=6	21.75	20.865	0.885	541.49
HCT 116 NOC t=9	21.645	20.765	0.88	543.37
HCT 116 NOC t=15	22.655	21.935	0.72	607.10
HCT 116 NOC t=18	22.005	21.03	0.975	508.74
HCT 116 NOC t=21	22.085	21.025	1.06	479.63
HCT 116 NOC t=24	22.715	21.38	1.335	396.39

Table 4. Expression of HCT116 colon carcinoma cells, synchronized with Nocodazole (Noc). Expression was monitored by quantitative PCR, as described in Table 2, above.

5

Experiments were also carried out to determine expression of HKID-1 in various tissues and cell types (see Tables 4-6). HKID-1 was found to be highly expressed in ovarian, breast, lung and a few colon tumor clinical samples (below).

WO 03/029434

PCT/US02/31948

2190.1 Expression in Oncology Phase II Plate				
Tissue Type	Mean 2190.1	$\beta$ 2 Mean	$\partial\partial$ Ct	Expression
PIT 400 Breast N	24.34	19.39	4.95	32.46
PIT 372 Breast N	25.09	20.7	4.39	47.53
CHT 558 Breast N	26.93	19.59	7.34	6.17
CLN 168 Breast T: IDC	25.23	20.43	4.8	35.90
MDA 304 Breast T: MD-IDC	24.55	18.77	5.77	18.33
NDR 57 Breast T: IDC-PD	24.25	19.09	5.16	28.07
NDR 132 Breast T: IDC/ILC	24.09	21.27	2.81	142.10
CHT 562 Breast T: IDC	24.15	19.32	4.82	35.40
NDR 12 Breast T	25.12	22.2	2.92	132.59
PIT 208 Ovary N	22.16	19.17	2.98	126.31
CHT 620 Ovary N	24.86	20.15	4.72	37.94
CLN 03 Ovary T	27.14	20	7.13	7.14
CLN 17 Ovary T	24.62	20.34	4.28	51.65
MDA 25 Ovary T	26.16	22.37	3.79	72.29
MDA 216 Ovary T	26.59	21.15	5.44	23.04
CLN 012 Ovary T	26.43	22.41	4.02	61.64
MDA 185 Lung N	25.63	21.11	4.51	43.89
CLN 930 Lung N	24.09	19.16	4.92	32.92
MDA 183 Lung N	22.58	18.14	4.45	45.91
MPI 215 Lung T-SmC	23.03	19.31	3.72	75.89
MDA 259 Lung T-PDNSCCL	23.22	20.45	2.77	147.11
CHT 832 Lung T-PDNSCCL	23.01	19.52	3.5	88.70
CHT 911 Lung T-SCC	22.81	20.07	2.73	150.73
MDA 262 Lung T-SCC	25.34	23.23	2.11	232.45
CHT 211 Lung T-AC	23.62	19.83	3.79	72.29
MDA 253 Lung T-PDNSCCL	23.36	18.41	4.96	32.24
NHBE	24.84	21.59	3.25	105.11
CHT 396 Colon N	27.1	24.41	2.69	154.96
CHT 523 Colon N	24.93	19.2	5.72	18.97
CHT 382 Colon T: MD	22.54	18.27	4.28	51.65
CHT 528 Colon T: MD	22.57	18.59	3.98	63.15
CLN 609 Colon T	24.03	19.09	4.94	32.58
CHT 372 Colon T: MD-PD	24.16	19.63	4.53	43.28
NDR 217 Colon-Liver Met	24.71	19.18	5.54	21.57
NDR 100 Colon-Liver Met	22.52	18.29	4.23	53.29
PIT 260 Liver N (female)	22.97	17.31	5.66	19.85
ONC 102 Hemangioma	25.22	19.59	5.62	20.33
A24 HMVEC-Arr	22.43	19.55	2.88	136.31
C48 HMVEC-Prol	24.02	21.11	2.9	133.97

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Table 5. Expression of 2190 in various tissues and cell lines, including normal (N) and tumor (T) tissues and cells. Key: IDC (invasive ductal carcinoma); ILC (invasive lobular carcinoma); SCC (squamous cell carcinoma); Liver Met (colon cancer liver metastases); HMVEC Arr (human microvascular endothelial cells-arresting); HMVEC Prol (HMVEC proliferating). Expression was monitored by quantitative PCR, as described in Table 2, above.

Phase 1.3.3 Expression of 2190.1 with $\beta 2$				
Tissue Type	Mean	$\beta 2$ Mean	$\Delta\Delta Ct$	Expression
Artery normal	27.9	21.48	6.42	11.6785
Vein normal	27.77	19.84	7.92	4.129
Aortic SMC EARLY	27.2	21.02	6.17	13.8401
Coronary SMC	26.22	21.75	4.46	45.2794
Static HUVEC	21.63	20.43	1.2	436.7864
Shear HUVEC	22.32	20.75	1.58	334.4819
Heart normal	22.55	18.54	4	62.2838
Heart CHF	22.93	18.77	4.17	55.5527
Kidney	22.98	19.59	3.39	95.3912
Skeletal Muscle	24.53	21.54	3	125.434
Adipose normal	24.51	19.73	4.79	36.272
Pancreas	24.45	21.15	3.3	101.5315
Primary osteoblasts	28.15	18.53	9.62	1.2708
Osteoclasts (differentiated)	23.34	16.93	6.41	11.7597
Skin normal	24.75	20.77	3.98	63.5925
Spinal cord normal	26.04	20.17	5.87	17.1577
Brain Cortex normal	24	20.82	3.19	109.9561
Brain Hypothalamus normal	25.45	21.2	4.25	52.556
Nerve	28.13	24.04	4.09	58.7202
DRG (Dorsal Root Ganglion)	25.88	21.13	4.75	37.0341
Glial Cells (Astrocytes)	28.32	22.1	6.22	13.4151
Glioblastoma	25.23	17.87	7.37	6.0662
Breast normal	24.56	20.13	4.43	46.2309
Breast tumor	21.54	17.94	3.6	82.4692
Ovary normal	24.11	19.7	4.41	47.039
Ovary Tumor	26.75	19.65	7.11	7.2641
Prostate Normal	24.34	19.47	4.88	33.9605
Prostate Tumor	21.18	17.38	3.8	71.7936
Epithelial Cells (Prostate)	24.22	21.19	3.03	122.4275
Colon normal	22.98	17.54	5.44	23.0355

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Colon Tumor	21.97	18.38	3.59	83.0429
Lung normal	22.43	17.77	4.65	39.83
Lung tumor	21.36	17.95	3.42	93.4281
Lung COPD	22.47	18.13	4.34	49.3776
Colon IBD	21.64	16.89	4.75	37.1627
Liver normal	23.04	19.26	3.77	73.0486
Liver fibrosis	24.1	20.86	3.24	105.8432
Dermal Cells- fibroblasts	25.38	19.43	5.95	16.176
Spleen normal	24.41	19.11	5.29	25.471
Tonsil normal	21.77	16.68	5.09	29.3601
Lymph node	23.05	17.97	5.08	29.6669
Small Intestine	25.11	19.64	5.47	22.4833
Skin-Decubitus	24	20	4.01	62.0683
Synovium	25.98	18.65	7.34	6.1936
BM-MNC (Bone marrow mononuclear cells)	22.91	16.34	6.57	10.5253
Activated PBMC	20.67	15.64	5.03	30.6069

Table 6. Expression of 2190 in various tissues and cell lines. Key: SMC (smooth muscle cell); CHF (congestive heart failure); COPD (chronic obstructive pulmonary disease); IBD (inflammatory bowel disease); PBMC (peripheral blood mononuclear cells (resting)). Expression was monitored by quantitative PCR, as described in Table 2, above.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

2190.1 Expression in Xenograft Panel				
Tissue Type	2190.1 Mean	$\beta$ 2 Mean	$\Delta\Delta$ Ct	Expression
MCF-7 Breast T	22.06	19.61	2.44	183.65
ZR75 Breast T	23.23	22.11	1.13	458.50
T47D Breast T	22.7	19.93	2.77	146.10
MDA 231 Breast T	22.36	19.52	2.84	140.15
MDA 435 Breast T	21.48	18.77	2.71	152.30
SKBr3 Breast	22.16	21.14	1.02	491.41
DLD 1 ColonT (stageC)	21.96	21.63	0.33	795.54
SW480 Colon T (stage B)	25.11	22.76	2.36	195.47
SW620 ColonT (stageC)	22.29	20.27	2.02	246.56
HCT116	24.68	23.66	1.02	491.41
HT29	22.13	18.81	3.33	99.79
Colo 205	21.29	17.84	3.45	91.51
NCIH125	24.43	21.23	3.21	108.44
NCIH67	22.79	22.15	0.64	643.94
NCIH322	24.32	22.31	2.01	248.27
NCIH460	24.49	21.35	3.14	113.44
A549	25.45	23.51	1.94	260.62
NHBE	24.66	22.54	2.12	230.05
SKOV-3 ovary	24.03	19.16	4.87	34.32
OVCAR-3 ovary	25.09	22.24	2.85	139.18
293 Baby Kidney	23.72	22.66	1.06	477.97
293T Baby Kidney	24.12	24.18	-0.06	1046.08

Table 7. Expression of 2190 in various tissues and cell lines. Expression was monitored by quantitative PCR, as described in Table 2, above.

5

This data was confirmed by ISH which localized HKID-1 to 2/2 normal ovary samples (low expression), 7/7 ovarian tumors (moderate to high expression), 3/3 normal lungs (low expression), 4/4 lung tumors (moderate expression), 1/1 normal colon (low expression), 2/2 colon tumors (high expression), and 2/2 colon to liver metastases (high expression). Expression was monitored by quantitative PCR, as described in Table 2, above.

10

Thus, the data indicates that HKID-1 is regulated similarly to cMyc in an ovarian cell model system. In addition, overexpression of HKID-1 is observed in

WO 03/029434

PCT/US02/31948

many human clinical tumor samples. Inhibition of MID 2190 (KID-1) serine/threonine kinase, may therefore assist in the reduction of tumor cell growth in a Myc dependent fashion.

5 Example 8: Expression of Recombinant HKID-1 Protein in COS Cells

To express the HKID-1 gene in COS cells, the pcDNA/Amp vector by Invitrogen Corporation (San Diego, CA) is used. This vector contains an SV40 origin of replication, an ampicillin resistance gene, an *E. coli* replication origin, a CMV promoter followed by a polylinker region, and an SV40 intron and polyadenylation  
10 site. A DNA fragment encoding the entire HKID-1 protein and an HA tag (Wilson *et al.* (1984) *Cell* 37:767) or a FLAG tag fused in-frame to its 3' end of the fragment is cloned into the polylinker region of the vector, thereby placing the expression of the recombinant protein under the control of the CMV promoter.

To construct the plasmid, the HKID-1 DNA sequence is amplified by PCR  
15 using two primers. The 5' primer contains the restriction site of interest followed by approximately twenty nucleotides of the HKID-1 coding sequence starting from the initiation codon; the 3' end sequence contains complementary sequences to the other restriction site of interest, a translation stop codon, the HA tag or FLAG tag and the last 20 nucleotides of the HKID-1 coding sequence. The PCR amplified fragment and  
20 the pcDNA/Amp vector are digested with the appropriate restriction enzymes and the vector is dephosphorylated using the CIAP enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA). Preferably the two restriction sites chosen are different so that the HKID-1 gene is inserted in the correct orientation. The ligation mixture is transformed into *E. coli* cells (strains HB101, DH5 $\alpha$ , SURE, available from Stratagene Cloning Systems, La  
25 Jolla, CA, can be used), the transformed culture is plated on ampicillin media plates, and resistant colonies are selected. Plasmid DNA is isolated from transformants and examined by restriction analysis for the presence of the correct fragment.

COS cells are subsequently transfected with the HKID-1-pcDNA/Amp  
30 plasmid DNA using the calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation methods, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Other suitable methods for transfecting host cells can be found in Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring*

WO 03/029434

PCT/US02/31948

*Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. The expression of the 22348, 23553, 25278, or 26212 polypeptide is detected by radiolabelling ( $^{35}\text{S}$ -methionine or  $^{35}\text{S}$ -cysteine available from NEN, Boston, MA, can be used) and immunoprecipitation (Harlow, E. and Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988) using an HA specific monoclonal antibody. Briefly, the cells are labeled for 8 hours with  $^{35}\text{S}$ -methionine (or  $^{35}\text{S}$ -cysteine). The culture media are then collected and the cells are lysed using detergents (RIPA buffer, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 50 mM Tris, pH 7.5). Both the cell lysate and the culture media are precipitated with an HA specific monoclonal antibody. Precipitated polypeptides are then analyzed by SDS-PAGE.

Alternatively, DNA containing the HKID-1 coding sequence is cloned directly into the polylinker of the pCDNA/Amp vector using the appropriate restriction sites. The resulting plasmid is transfected into COS cells in the manner described above, and the expression of the HKID-1 polypeptide is detected by radiolabelling and immunoprecipitation using a HKID-1 specific monoclonal antibody.

This invention may be embodied in many different forms and should not be construed as limited to the embodiments set forth herein; rather, these embodiments are provided so that this disclosure will fully convey the invention to those skilled in the art. Many modifications and other embodiments of the invention will come to mind in one skilled in the art to which this invention pertains having the benefit of the teachings presented in the foregoing description. Although specific terms are employed, they are used as in the art unless otherwise indicated.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

## THAT WHICH IS CLAIMED:

1. A method for modulating the level or activity of a polypeptide in a cell, said method comprising contacting a cell expressing said polypeptide with an agent under conditions that allow the agent to modulate the level or activity of the polypeptide, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.
2. The method of claim 1, wherein said agent is an antibody.
3. The method of claim 1, wherein said cell is *in vitro*.
4. The method of claim 1, wherein said cell is *in vivo*.
5. The method of claim 4 wherein said cell is from a subject having a proliferative disorder involving said cell.
6. The method of claim 1 wherein said modulation is in a subject having or predisposed to having a disorder involving cancer.
7. A method for modulating the level or activity of a polypeptide in a cell, the method comprising contacting a cell expressing said polypeptide with an agent under conditions that allow the agent to modulate the level or activity of the polypeptide, wherein said polypeptide is selected from the group consisting of:
  - (a) a polypeptide comprising the amino acid sequence of a sequence variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, wherein said sequence variant has kinase activity and is encoded by a nucleotide sequence having at least about 90% sequence identity with the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1;
  - (b) a polypeptide comprising the amino acid sequence of a sequence variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, wherein said sequence variant has kinase activity and is encoded by a nucleotide sequence having at

WO 03/029434

PCT/US02/31948

least about 95% sequence identity with the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1; and

- (c) a polypeptide comprising the amino acid sequence of a sequence variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:1, wherein said sequence variant has kinase activity and is encoded by a nucleotide sequence having at least about 98% sequence identity with the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1.

8. The method of claim 7, wherein said agent is an antibody.
9. The method of claim 7, wherein said cell is *in vitro*.
10. The method of claim 7, wherein said cell is *in vivo*.
11. The method of claim 10 wherein said cell is from a subject having a proliferative disorder involving said cell.
12. The method of claim 7 wherein said modulation is in a subject having or predisposed to having a disorder involving cancer.
13. A method for modulating the level of a nucleic acid molecule in a cell, said method comprising contacting a cell containing said nucleic acid molecule with an agent under conditions that allow the agent to modulate the level of the nucleic acid molecule, wherein said nucleic acid molecule has a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1;
- (b) a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2.
14. The method of claim 13, wherein said cell is *in vitro*.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

15. The method of claim 13, wherein said cell is *in vivo*.
16. The method of claim 15 wherein said cell is from a subject having a proliferative disorder involving said cell.
- 5 17. The method of claim 13 wherein said modulation is in a subject having or predisposed to having a disorder involving cancer.
18. A method for modulating the level of a nucleic acid molecule in a cell,  
10 said method comprising contacting a cell containing said nucleic acid molecule with an agent under conditions that allow the agent to modulate the level of the nucleic acid molecule, wherein said nucleic acid molecule has a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide having kinase  
15 activity, wherein said nucleotide sequence has at least about 90% sequence identity with the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1;
- (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide having kinase  
activity, wherein said nucleotide sequence has at least about 95% sequence identity with the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1; and
- 20 (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide having kinase activity, wherein said nucleotide sequence has at least about 98% sequence identity with the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1.
19. The method of claim 18, wherein said cell is *in vitro*.
- 25 20. The method of claim 18, wherein said cell is *in vivo*.
21. The method of claim 20 wherein said cell is from a subject having a proliferative disorder involving said cell.
- 30 22. The method of claim 19 wherein said modulation is in a subject having or predisposed to having a disorder involving cancer.

WO 03/029434

PCT/US02/31948

SEQ ID NO:1

1/5

GGCGCTCCGCCTGCTGCGCGTCTACGCGGTCCCGCGGGCCCTCCCGGGCCACTGCGCCG  
 CGCGGACCGCCTCGGGCTCGGACGGCCGGTGTCCCGGGCGCGCGCTCGCCGGATCGGC  
 CGCGGCTTCGGCGCCTGGGGCTCGGGGCTCCGGGGAGGCGTCCGCCGATGCTGCTCT  
 CCAAGTTCGGCTCCCTGGCGCACCCTGCGGGCCCGCGGCGTGGACCACCTCCCGGTGA  
 AGATCCTCGACCCAGCCAAGCGGACAAGGAGAGCTTCGAGAAGGCGTACCAGTGGGCG  
 CCGTGTGGTAGCGCGGCTTCGGCACGGTCTACGCGGTAGCCGATCCGCCAGCGGC  
 TCCCGGTGGCTGTGAAGCAGCTGTAAGGAGCGGGTGACCGAGTGGGCGCGCCGGCGCG  
 GCGGACCGTCCCTGGAGGTGGTGTCTGCGCAAGTGGGCGCGCGGGCGGGCGCG  
 GCGGCTCATCCGCTGCTGGACTGGTTCGAGCGGCCGACGGCTTCCTGCTGGTGGTGG  
 AGCGGCCGAGCCGCGCAGGACCTCTTCGACTTTATCAGCGAGCGCGCGCCCTGGACC  
 AGCCGCTGGCGCGCCGCTTCTTCGCGCAGGTGCTGGCCCGCTGCGCCACTGCCACAGCT  
 GCGGGGCTGTGCACCGGACATTAAGGACGAAAATCTGCTTGTGGACCTGCGCTCCGGAG  
 AGCTCAAGCTCACTGACTTCGGTTCGGGTGCGTGTCAAGGACACGGTCTACACCGACT  
 TCGAGCGCACCGAGTGTACAGCCCCCGAGTGGATCCGCTACCACCGCTACCACGGGC  
 GCTCGGCCACCGTGTGGTGGTGGCGTGGTCTCTACGATATGCTGTGGGACATCC  
 CCTTCGAGCAGGAGGAGATCCCTCCGAGCCGCTGCTCTTCGGAGGAGGCTCTCTC  
 CAGAGTGCCAGCAGTGTACCGCTGGTGTCTGCTCCCGCGCCCTCAGAGCGCGCGTCCG  
 TGGATCAGATTCGCGCCATCCCTGGATGCTGGGGCTGACGGGGCGCCCGGAGAGCT  
 GTGACCTGCGGCTGTGCACCTCGACCTGATGACGTGGCCAGCACCAGTCCAGCAGCG  
 AGAGCTTGTGAGGAGCTGCACCTGACTGGGAGTGGGGACCACTGCTTGGCCAGACC  
 TGGGACGCCCCAGACCTGACTTTTCTGCGTGGGCGCTCTCTCTGCGGAAGCAGT  
 GACCTCTGACCCCTGCTGACCTTCGCTTGTAGTGCCCTTTGAAACGCTGGTCCCGCGGAC  
 TTGTTTCTCAAGCTCTGCTGTGTCAAAGACGCTCCGGTCCGAGGTCCCGCTGCCCTGG  
 GTGATACTTGAACCCAGACGCCCTCTGTGCTGTGTCCGGAGGCGGCTTCCCAT  
 CTGCTTCCACCCCGGAGCTCTTCCCGCGCGCAGGTCCTCAAGCCACCTCCCGCCCT  
 CAGTCTGCGGTGTGCTCTGGGCAGTCTGCACACACAATGCAAGTCTGGCYTCCGC  
 GCCCGCCCGCCACGCGAGCCGTACCCCGCCCACTCTGTTATTTATGGTGTGACCC  
 TGGAGTGCCTCGGCCACCGGGCTATTTATGTTAATTTATTTGTTGAGGTTATTT  
 CCTCTGAGCAGTCTGCCTCTCCCAAGCCCAAGGGACAGTGGGGAGGCAAGGGAGGGGT  
 GGCTGTGGTCCAGGGACCCAGGCCCTGATTCCTGTGCTGGCGTCTGCTGGCCCCG  
 CTGTGAGAGATGAACATGTATAGTGGCTAACTTAAGGGAGTGGGTGACCTGACACTT  
 CCAGGCACTGTGCCAGGTTTGGGTTTAAATTTATGACTTGTACAGTCTGCTTGTGG  
 GCTCTGAAAGCTGGGGTGGGGCCAGAGCCTGAGCGTTAATTTATTCAGTACCTGTGTTT  
 GTGTGAATGCGGTGTGTGAGGATCCGAGATGGGGTCTTTCAGTTCAAAGTGAAT  
 GTCGGAGATCAATTTTTTATACAGGTATTTCAATTAATAATGTTTTTGTACATAGAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGG

SEQ ID NO:2

MLLSKFGSLAHLCPGGVDHLPVKILQPAKADKESFEKAYQVGAVLGSGGFGTVYAGSRIADGLP  
 VAVKHVVKERVTEWGSLLGATVPLEVLLRKYGAAGGARGVIRLLDWFERPDPFLLVLERPEPAQ  
 DLFDFTIRGALDEPLARRFFAQVLAAVRHCHSCGVVHRDIKIDENLLVDRSGELKLIDFGSGAL  
 LKDTVYTDYDFDTRVYSPPEWIRYHRYHGRSATVWSLGVLLYDMVCGDIPFEQDEILRGRLLFR

Figure 1A

WO 03/029434

PCT/US02/31948

2/5

RVSPECQQLIRWCLSLRPSERPSLDQIAAHPWMLGADGGAPESCDLRLCTLDPDDVASTTSSSES  
L

SEQ ID NO:3

ATGCTGCTCTCCAAGTTCGGCTCCCTGGCGCACCTCTGCGGGCCCGGCGGTGGACCACCTCCC  
GGTGAAGATCCTGCAGCCAGCCAAGGCGGACAAGGAGAGCTTCGAGAAGGCGTACCAGGTGGGCG  
CCGTGCTGGGTAGCGCGGCTTCGGCACGGTCTACGCGGGTAGCCGCATCGCCGACGGGCTCCCG  
GTGGCTGTGAAGCACGTGGTGAAGGAGCGGTTGACCGAGTGGGGCAGCTGGGCGGCGGACCGT  
GCCCTGGAGGTGGTGTCTGTCGCAAGGTGGGCGGGCGGGCGGCGCGCGCGCTCATCCGCC  
TGCTGGACTGGTTCGAGCGGCCGACGGCTTCCTGCTGGTGGTGGAGCGGCGGAGCCGGCGCAG  
GACCTCTCGACTTTATCACGGAGCGCGGCGCCCTGGACGAGCCGCTGGCGCGCGCTTCTTCGC  
GCAGGTGCTGGCCCGGTGCGCCACTGCCACAGCTGCGGGTCTGTACCCGCGACATTAAGGACG  
AAAATCTGCTTGTGGACCTGCGCTCCGGAGAGCTCAAGCTCATCGACTTCGGTTCGGGTGCGCTG  
CTCAAGGACACGGTCTACACCGACTTCGACGGCACCCGAGTGTACAGCCCCGGAGTGGATCCG  
CTACCACCGCTACCACGGGCGCTCGGCCACCGTGTGCTGCTGGGCGTCTTCTACGATATGG  
TGTGTGGGACATCCCTTCGAGCAGGACGAGGATCCCTCCGAGGCGGCTGCTCTTCCGGAGG  
AGGGTCTCTCCAGAGTGCAGCAGCTGATCCGGTGGTGCCTGTCCCTCGGCCCTCAGAGCGGCC  
GTCGTGGATCAGATTGCGGCCATCCCTGGATGCTGGGGCTGACGGGGCGCCCGGAGAGCT  
GTGACCTCGGCTGTGACCCCTCGACCTGATGACGTGGCCAGCACCAGTCCAGCAGCGAGAGC  
TTG

Figure 1B

WO 03/029434

PCT/US02/31948

3/5

	Score	E-value
	-----	-----
PF00069 Eukaryotic protein kinase domain	262.4	5.9e-75

yelleklGeGsfgkVykakhk.tgkivAvKilkkesls.....  
y+++ +lG+G+fG+Vy + ++ +g +vAvK + ke++ + ++ ++  
40 YQVGAVLGSGGFGTVYAGSRiAdGLPVAVKHVVKERVtewgslggat 86

.lrEiqilkrIs...HpNIvrlIlgvfedtddhlyImEymegG.dLfdy  
E+ +l+++ ++ +rll++fe ++d + lv+E e +dLfd+  
87 vPLEVLLRkVgaaggARGVIRLLDWFf-RPDGFLLVLERPEPAqDLFDf 135

lrrngplseakialQilrGleYlHsngivHRDLKpeNILden.gtv  
+++g+l+e+ a++++ Q+l ++ ++Hs+g+vHRD+K eN+L+d ++g +  
136 ITERGALDEPLARRFFAQVLA AVRHCHSCGVVHRDIKDENLLVDLrsGEL 185

KiaDFGLArll..eklttfvGTpwYmmAPEvileg.rgysskvDvWSlGv  
K++DFG +ll++++t+f GT++Y +PE+ +++r++++ + vWSlGv  
186 KLIDFGSGALLkdTVYTDFDgTRVYS-PPEW-IRYhRYHGRSATVWSLGv 233

iLyElItggplfpgadlpaftggdevdqliifvklPfsdelpktridpl  
+Ly +++g ++Pf++  
234 LLYDMVCG-----DIPFEQ-----D 248

eelfrikrrrlpIpsncSeelkdLlkkcLnkDPskRpGsatakeilnhpw  
ee++r+ + + +++S+e+++L+++cL + Ps+Rp + +i +hpw  
249 EEILRGRLL---FRRRVSPECQQLIRWCLSLRPSERP---SLDQIAAHPW 292

f  
+  
293 M 293

Figure 2



WO 03/029434

PCT/US02/31948

5/5

MLLSKIGSLAHLCRAGPCNDLHAKILAPGK-DKEPLESOY Majority  
 10 20 30 40  
 1 MLLSKFGSLAHLCPNPSNMHLLPVKILLOPVKVDKPPPEKVA frog PIM-1.PRO  
 1 MLLSKFGSLAHLCCGVDHLEPVKILLOPAKADRESFEKAY HKID-1.PRO  
 1 MLLSKINSLAHL-RAAPCNDLHAKILAPGK-EKEPLESOY human PIM-1.PRO  
 1 MLLSKFGSLAHLCCGVDHLEPVKILLOPAKADRESFEKAY murine PIM-1.PRO  
 1 MLLSKINSLAHL-RAAPCNDLHAKILAPGK-EKEPLESOY rat PIM-1.PRO  
 QVGPVLGSGGFGSVYSGIRVADGLPVAVKHVEKDRVSDWG Majority  
 50 60 70 80  
 41 OVGSVVAVSGGFGTVVYSDSRIADGQPVAVKHVAKERVTEWG frog PIM-1.PRO  
 41 OVGAVLGGGFGTVVYAGSRIADGLPVAVKHVEKERVTEWG HKID-1.PRO  
 41 OVGGLLGGGFGTVVYSGIRVADNLPVAIKHVERDRISDWG human PIM-1.PRO  
 39 OVGGLLGGGFGTVVYSGIRVADNLPVAIKHVERDRISDWG murine PIM-1.PRO  
 41 OVGAVLGGGFGTVVYAGSRIADGLPVAVKHVEKERVTEWG rat PIM-1.PRO  
 39 OVGGLLGGGFGTVVYSGIRVADNLPVAIKHVERDRISDWG rat PIM-1.PRO  
 ELPNGTRVPLEVLLKVVSSA--FSGVIRLLDWFERPDSF Majority  
 90 100 110 120  
 81 TL-NGVMVPLEVLLKVVETA--FRGVIRLLDWFERPDSF frog PIM-1.PRO  
 81 SL-GCAVIVLEVLLKVVGAAGGARGVIRLLDWFERPDSF HKID-1.PRO  
 79 ELPNGTRVPMVEVLLKVVSSG--FSGVIRLLDWFERPDSF human PIM-1.PRO  
 79 ELPNGTRVPMVEVLLKVVSSD--FSGVIRLLDWFERPDSF murine PIM-1.PRO  
 81 SL-GCAVIVLEVLLKVVGAAGGARGVIRLLDWFERPDSF rat PIM-1.PRO  
 79 ELPNGTRVPMVEVLLKVVSSG--FSGVIRLLDWFERPDSF rat PIM-1.PRO  
 VLVLRPEPVODLDFDFTIRGALDEDLARGFFWQVLEAVR Majority  
 130 140 150 160  
 118 LILVMERPEPVKIDLEFDYITERRGALDEDLARGFFWQVLEAVR frog PIM-1.PRO  
 118 LILVLRPEPAODLDFDFTIRGALDEDLARGFFWQVLEAVR HKID-1.PRO  
 117 VILLRPEPEVODLDFDFTIRGALDEDLARGFFWQVLEAVR human PIM-1.PRO  
 117 VILLRPEPEVODLDFDFTIRGALDEDLARGFFWQVLEAVR murine PIM-1.PRO  
 117 VILLRPEPEVODLDFDFTIRGALDEDLARGFFWQVLEAVR rat PIM-1.PRO  
 117 VILLRPEPEVODLDFDFTIRGALDEDLARGFFWQVLEAVR rat PIM-1.PRO  
 HCHNCGVHRDIKDENLLVDLNRGELKLIDFGSGALLKDT Majority  
 170 180 190 200  
 158 HCVNCGVHRDIKDENLLVDLNRGELKLIDFGSGALLKDT frog PIM-1.PRO  
 158 HCVNCGVHRDIKDENLLVDLNRGELKLIDFGSGALLKDT HKID-1.PRO  
 157 HCHNCGVHRDIKDENLLVDLNRGELKLIDFGSGALLKDT human PIM-1.PRO  
 157 HCHNCGVHRDIKDENLLVDLNRGELKLIDFGSGALLKDT murine PIM-1.PRO  
 157 HCHNCGVHRDIKDENLLVDLNRGELKLIDFGSGALLKDT rat PIM-1.PRO  
 157 HCHNCGVHRDIKDENLLVDLNRGELKLIDFGSGALLKDT rat PIM-1.PRO  
 VYTDGTRVYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWSLGVLLYDMV Majority  
 210 220 230 240  
 198 VYTDGTRVYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWSLGVLLYDMV frog PIM-1.PRO  
 200 VYADDFGTRVYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWSLGVLLYDMV HKID-1.PRO  
 197 VYTDGTRVYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWSLGVLLYDMV human PIM-1.PRO  
 197 VYTDGTRVYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWSLGVLLYDMV murine PIM-1.PRO  
 200 VYTDGTRVYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWSLGVLLYDMV rat PIM-1.PRO  
 197 VYTDGTRVYSPPEWIRYHRYHGRSAAVWSLGVLLYDMV rat PIM-1.PRO  
 CGDIPFEODEEIVRGOVYFRQVRSSECOOLIRWCLSLRPS Majority  
 250 260 270 280  
 238 CGDIPFEODEEIVRVRICERRRISTECCOOLIRWCLSLRPS frog PIM-1.PRO  
 238 CGDIPFEODEEIVRGRVFRQVRSSECOOLIRWCLSLRPS HKID-1.PRO  
 237 CGDIPFEODEEIVRGOVYFRQVRSSECOOLIRWCLSLRPS human PIM-1.PRO  
 237 CGDIPFEODEEIVRGOVYFRQVRSSECOOLIRWCLSLRPS murine PIM-1.PRO  
 240 CGDIPFEODEEIVRGRVFRQVRSSECOOLIRWCLSLRPS rat PIM-1.PRO  
 237 CGDIPFEODEEIVRGOVYFRQVRSSECOOLIRWCLSLRPS rat PIM-1.PRO  
 DRPSLEETANHFWM-QDDLPOETCDLHLHLSL-PDSSST Majority  
 290 300 310 320  
 278 DRPITLQIYDHFWMCKCDIVKSEKCDLRRLIDPDSSST frog PIM-1.PRO  
 280 DRPITLQIYDHFWMKLGADGKSEKCDLRRLIDPDSSST HKID-1.PRO  
 277 DRPITLQIYDHFWM-ODVLLPOETAEHLHLSL-PGSSK human PIM-1.PRO  
 277 DRPITLQIYDHFWM-OGDLPQIYDHFWM-ODVLLPOETAEHLHLSL-PGSSK murine PIM-1.PRO  
 280 DRPITLQIYDHFWMKLGADGKSEKCDLRRLIDPDSSST rat PIM-1.PRO  
 277 DRPITLQIYDHFWM-QDVLVPOETAEHLHLSL-PGSSK rat PIM-1.PRO  
 -SS-ESL Majority  
 310 SSSNESL frog PIM-1.PRO  
 320 TSSSES� HKID-1.PRO  
 313 SSSNESL human PIM-1.PRO  
 313 TSSSES� murine PIM-1.PRO  
 320 TSSSES� rat PIM-1.PRO  
 313 TSSSES� rat PIM-1.PRO

Figure 4

WO 03/029434

PCT/US02/31948

## SEQUENCE LISTING

<110> Rosanna Kapeller-Libermann  
 Laura A. Rudolph-Owen  
 Kyle MacBeth

<120> NOVEL MOLECULES OF THE HKID-1-RELATED PROTEIN FAMILY AND USES THEREOF

<130> 35800/254297

<150> 09/971,791  
 <151> 2001-10-04

<150> 09/644,450  
 <151> 2000-08-23

<150> 09/237,543  
 <151> 1999-01-26

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
 <211> 2126  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (171)...(1151)

<400> 1  
 ggcgctccgc ctgctgctcg tatacggcgt ccccgcgggc cttccgggcc cactgctccg 60  
 cgcggaccgc ctccggctcg gacggccggg gtccccggcg cgcgctcgc cggatcggc 120  
 cgcgctctcg gcgctgggg ctccgggctc cggggaggcc gtcccccgc atg ctg 176  
 Met Leu  
 1

ctc tcc aag ttc ggc tcc ctg gcg cac ctg tgc ggg ccc ggc ggc gtg 224  
 Leu Ser Lys Phe Gly Ser Leu Ala His Leu Cys Gly Pro Gly Gly Val  
 5 10 15

gac cac ctg ccg gtg aag atc ctg cag cca gcc aag gcg gac aag gag 272  
 Asp His Leu Pro Val Lys Ile Leu Gln Pro Ala Lys Ala Asp Lys Glu  
 20 25 30

agc ttc gag aag gcg tac cag gtg ggc gcc gtg ctg ggt agc ggc ggc 320  
 Ser Phe Glu Lys Ala Tyr Gln Val Gly Ala Val Leu Gly Ser Gly Gly  
 35 40 45 50

ttc ggc acg gtc tac gcg ggt agc cgc atc gcc gac ggg ctc ccg gtg 368  
 Phe Gly Thr Val Tyr Ala Gly Ser Arg Ile Ala Asp Gly Leu Pro Val  
 55 60 65

gct gtg aag cac gtg gtg aag gag cgg gtg acc gag tgg ggc agc ctg 416  
 1

WO 03/029434

PCT/US02/31948

Ala Val Lys His Val Val Lys Glu Arg Val Thr Glu Trp Gly Ser Leu  
70 75 80

ggc ggc ggc acc gtg ccc ctg gag gtg gtg ctg ctg cgc aag gtg ggc 464  
Gly Gly Ala Thr Val Pro Leu Glu Val Val Leu Leu Arg Lys Val Gly  
85 90 95

gcg gcg ggc ggc gcg cgc ggc gtc atc cgc ctg ctg gac tgg ttc gag 512  
Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu  
100 105 110

cgg ccc gac ggc ttc ctg ctg gtg ctg gag cgg ccc gag ccg gcg cag 560  
Arg Pro Asp Gly Phe Leu Leu Val Leu Glu Arg Pro Glu Pro Ala Gln  
115 120 125 130

gac ctc ttc gac ttt atc acg gag cgc ggc gcc ctg gac gag ccg ctg 608  
Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Asp Glu Pro Leu  
135 140 145

ggc cgc cgc ttc ttc gcg cag gtg ctg gcc gcc gtg cgc cac tgc cac 656  
Ala Arg Arg Phe Phe Ala Gln Val Leu Ala Ala Val Arg His Cys His  
150 155 160

agc tgc ggg gtc gtg cac cgc gac att aag gac gaa aat ctg ctt gtg 704  
Ser Cys Gly Val Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Leu Leu Val  
165 170 175

gac ctg cgc tcc gga gag ctc aag ctc atc gac ttc ggt tcg ggt gcg 752  
Asp Leu Arg Ser Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala  
180 185 190

ctg ctc aag gac acg gtc tac acc gac ttc gac ggc acc cga gtg tac 800  
Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr  
195 200 205 210

agc ccc ccg gag tgg atc cgc tac cac cgc tac cac ggg cgc tcg gcc 848  
Ser Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala  
215 220 225

acc gtg tgg tcg ctg ggc gtg ctt ctc tac gat atg gtg tgt ggg gac 896  
Thr Val Trp Ser Leu Gly Val Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp  
230 235 240

atc ccc ttc gag cag gac gag gag atc ctc cga ggc cgc ctg ctc ttc 944  
Ile Pro Phe Glu Gln Asp Glu Glu Ile Leu Arg Gly Arg Leu Leu Phe  
245 250 255

cgg agg agg gtc tot cca gag tgc cag cag ctg atc cgg tgg tgc ctg 992  
Arg Arg Arg Val Ser Pro Glu Cys Gln Gln Leu Ile Arg Trp Cys Leu  
260 265 270

tcc ctg cgg ccc tca gag cgg ccg tcg ctg gat cag att gcg gcc cat  
1040  
Ser Leu Arg Pro Ser Glu Arg Pro Ser Leu Asp Gln Ile Ala Ala His  
275 280 285 290

ccc tgg atg ctg ggg gct gac ggg ggc gcc ccg gag agc tgt gac ctg  
1088  
Pro Trp Met Leu Gly Ala Asp Gly Gly Ala Pro Glu Ser Cys Asp Leu  
295 300 305



WO 03/029434

PCT/US02/31948

Ser Leu Gly Gly Ala Thr Val Pro Leu Glu Val Val Leu Leu Arg Lys  
85 90 95  
Val Gly Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp  
100 105 110  
Phe Glu Arg Pro Asp Gly Phe Leu Leu Val Leu Glu Arg Pro Glu Pro  
115 120 125  
Ala Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Asp Glu  
130 135 140  
Pro Leu Ala Arg Arg Phe Phe Ala Gln Val Leu Ala Val Arg His  
145 150 155 160  
Cys His Ser Cys Gly Val Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Leu  
165 170 175  
Leu Val Asp Leu Arg Ser Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser  
180 185 190  
Gly Ala Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg  
195 200 205  
Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg  
210 215 220  
Ser Ala Thr Val Trp Ser Leu Gly Val Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys  
225 230 235 240  
Gly Asp Ile Pro Phe Glu Gln Asp Glu Glu Ile Leu Arg Gly Arg Leu  
245 250 255  
Leu Phe Arg Arg Arg Val Ser Pro Glu Cys Gln Gln Leu Ile Arg Trp  
260 265 270  
Cys Leu Ser Leu Arg Pro Ser Glu Arg Pro Ser Leu Asp Gln Ile Ala  
275 280 285  
Ala His Pro Trp Met Leu Gly Ala Asp Gly Gly Ala Pro Glu Ser Cys  
290 295 300  
Asp Leu Arg Leu Cys Thr Leu Asp Pro Asp Asp Val Ala Ser Thr Thr  
305 310 315 320  
Ser Ser Ser Glu Ser Leu  
325

<210> 3  
<211> 978  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(978)

<400> 3  
atg ctg ctc tcc aag ttc ggc tcc ctg gcg cac ctc tgc ggg ccc ggc 48  
Met Leu Leu Ser Lys Phe Gly Ser Leu Ala His Leu Cys Gly Pro Gly  
1 5 10 15  
ggc gtg gac cac ctc ccg gtg aag atc ctg cag cca gcc aag gcg gac 96  
Gly Val Asp His Leu Pro Val Lys Ile Leu Gln Pro Ala Lys Ala Asp  
20 25 30  
aag gag agc ttc gag aag gcg tac cag gtg ggc gcc gtg ctg ggt agc 144  
Lys Glu Ser Phe Glu Lys Ala Tyr Gln Val Gly Ala Val Leu Gly Ser  
35 40 45  
ggc ggc ttc ggc acg gtc tac gcg ggt agc cgc atc gcc gac ggg ctc 192  
Gly Gly Phe Gly Thr Val Tyr Ala Gly Ser Arg Ile Ala Asp Gly Leu  
50 55 60

WO 03/029434

PCT/US02/31948

ccg gtg gct gtg aag cac gtg gtg aag gag cgg gtg acc gag tgg ggc 240  
 Pro Val Ala Val Lys His Val Val Lys Glu Arg Val Thr Glu Trp Gly  
 65 70 75 80  
 agc ctg ggc ggc gcg acc gtg ccc ctg gag gtg gtg ctg ctg cgc aag 288  
 Ser Leu Gly Gly Ala Thr Val Pro Leu Glu Val Val Leu Leu Arg Lys  
 85 90 95  
 gtg ggc gcg gcg ggc ggc ggc cgc ggc gtc atc cgc ctg ctg gac tgg 336  
 Val Gly Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp  
 100 105 110  
 ttc gag cgg ccc gac ggc ttc ctg ctg gtg ctg gag cgg ccc gag cgg 384  
 Phe Glu Arg Pro Asp Gly Phe Leu Leu Val Leu Glu Arg Pro Glu Pro  
 115 120 125  
 gcg cag gac ctc ttc gac ttt atc acg gag cgc ggc gcc ctg gac gag 432  
 Ala Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Asp Glu  
 130 135 140  
 ccg ctg gcg cgc cgc ttc ttc gcg cag gtg ctg gcc gcc gtg cgc cac 480  
 Pro Leu Ala Arg Arg Phe Phe Ala Gln Val Leu Ala Ala Val Arg His  
 145 150 155 160  
 tgc cac agc tgc ggg gtc gtg cac cgc gac att aag gac gaa aat ctg 528  
 Cys His Ser Cys Gly Val Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Leu  
 165 170 175  
 ctt gtg gac ctg cgc tcc gga gag ctc aag ctc atc gac ttc ggt tcg 576  
 Leu Val Asp Leu Arg Ser Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser  
 180 185 190  
 ggt gcg ctg ctc aag gac acg gtc tac acc gac ttc gac ggc acc cga 624  
 Gly Ala Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg  
 195 200 205  
 gtg tac agc ccc ccg gag tgg atc cgc tac cac cgc tac cac ggg cgc 672  
 Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg  
 210 215 220  
 tcg gcc acc gtg tgg tcg ctg ggc gtg ctt ctc tac gat atg gtg tgt 720  
 Ser Ala Thr Val Trp Ser Leu Gly Val Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys  
 225 230 235 240  
 ggg gac atc ccc ttc gag cag gac gag gag atc ctc cga ggc cgc ctg 768  
 Gly Asp Ile Pro Phe Glu Gln Asp Glu Glu Ile Leu Arg Gly Arg Leu  
 245 250 255  
 ctc ttc cgg agg agg gtc tct cca gag tgc cag cag ctg atc cgg tgg 816  
 Leu Phe Arg Arg Arg Val Ser Pro Glu Cys Gln Gln Leu Ile Arg Trp  
 260 265 270  
 tgc ctg tcc ctg cgg ccc tca gag cgg ccg tcg ctg gat cag att gcg 864  
 Cys Leu Ser Leu Arg Pro Ser Glu Arg Pro Ser Leu Asp Gln Ile Ala  
 275 280 285  
 gcc cat ccc tgg atg ctg ggg gct gac ggg ggc gcc ccg gag agc tgt 912  
 Ala His Pro Trp Met Leu Gly Ala Asp Gly Gly Ala Pro Glu Ser Cys  
 290 295 300

WO 03/029434

PCT/US02/31948

gac ctg cgg ctg tgc acc ctc gac cct gat gac gtg gcc agc acc acg 960  
 Asp Leu Arg Leu Cys Thr Leu Asp Pro Asp Asp Val Ala Ser Thr Thr  
 305 310 315 320

tcc agc agc gag agc ttg 978  
 Ser Ser Ser Glu Ser Leu  
 325

<210> 4  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> eukaryotic protein kinase domain

<400> 4  
 Tyr Gln Val Gly Ala Val Leu Gly Ser Gly Gly Phe Gly Thr Val Tyr  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Ser Arg Ile Ala Asp Gly Leu Pro Val Ala Val Lys His Val  
 20 25 30  
 Val Lys Glu Arg Val Thr Glu Trp Gly Ser Leu Gly Gly Ala Thr Val  
 35 40 45  
 Pro Leu Glu Val Val Leu Leu Arg Lys Val Gly Ala Ala Gly Gly Ala  
 50 55 60  
 Arg Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg Pro Asp Gly Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Val Leu Glu Arg Pro Glu Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp Phe  
 85 90 95  
 Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Asp Glu Pro Leu Ala Arg Arg Phe Phe  
 100 105 110  
 Ala Gln Val Leu Ala Ala Val Arg His Cys His Ser Cys Gly Val Val  
 115 120 125  
 His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Leu Leu Val Asp Leu Arg Ser Gly  
 130 135 140  
 Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Lys Asp Thr  
 145 150 155 160  
 Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp  
 165 170 175  
 Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Thr Val Trp Ser Leu  
 180 185 190  
 Gly Val Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu Gln  
 195 200 205  
 Asp Glu Glu Ile Leu Arg Gly Arg Leu Leu Phe Arg Arg Val Ser  
 210 215 220  
 Pro Glu Cys Gln Gln Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ser Leu Arg Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Glu Arg Pro Ser Leu Asp Gln Ile Ala Ala His Pro Trp Met  
 245 250

<210> 5  
 <211> 455  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5  
 Met Pro Lys Leu His Gln Pro Leu Val Asn Arg Gln Gly Ala Ser Gly

WO 03/029434

PCT/US02/31948

```

1           5           10           15
Phe Pro Ser Thr Thr Leu Pro Asp Ser Lys Gln Pro His Arg Lys Val
20
Ser Leu Gly Arg Lys Glu Ala Glu Leu Gln Ala Ala Pro Pro Pro Arg
35
Arg Asp Thr Cys Leu Arg Gly Pro Lys Pro Arg Gly Glu Ala Ala Gly
50
Ala Cys Glu Pro Leu Gly Gln Leu Pro Ser Thr Gly Phe Arg Ala Ala
65
Thr Gly Gln Leu Arg Arg Ala Ala Ala Pro Leu Ser Ala Arg Pro Arg
85
Gly Arg Gly Ile Arg Arg Ala Val Cys Gly Gln Glu Asp Arg Pro Pro
100
Ala Ser Val Pro Asp Gly Ser Glu Ala Ala Pro His Ala Arg Pro Pro
115
Ala Met Leu Leu Ser Lys Phe Gly Ser Leu Ala His Leu Cys Gly Pro
130
Gly Gly Val Asp His Leu Pro Val Lys Ile Leu Gln Pro Ala Lys Ala
145
Asp Lys Glu Ser Phe Glu Lys Val Tyr Gln Val Gly Ala Val Leu Gly
165
Ser Gly Gly Phe Gly Thr Val Tyr Ala Gly Ser Arg Ile Ala Asp Gly
180
Leu Pro Val Ala Val Lys His Val Val Lys Glu Arg Val Thr Glu Trp
195
Gly Ser Leu Gly Gly Met Ala Val Pro Leu Glu Val Val Leu Leu Arg
210
Lys Val Gly Ala Ala Gly Gly Ala Arg Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp
225
Trp Phe Glu Arg Pro Asp Gly Phe Leu Leu Val Leu Glu Arg Pro Glu
245
Pro Ala Gln Asp Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Asp
260
Glu Pro Leu Ala Arg Arg Phe Phe Ala Gln Val Leu Ala Ala Val Arg
275
His Cys His Asn Cys Gly Val Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn
290
Leu Leu Val Asp Leu Arg Ser Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly
305
Ser Gly Ala Val Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr
325
Arg Val Tyr Ser Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly
340
Arg Ser Ala Thr Val Trp Ser Leu Gly Val Leu Leu Tyr Asp Met Val
355
Cys Gly Asp Ile Pro Phe Glu Gln Asp Glu Glu Ile Leu Arg Gly Arg
370
Leu Phe Phe Arg Arg Arg Val Ser Pro Glu Cys Gln Gln Leu Ile Glu
385
Trp Cys Leu Ser Leu Arg Pro Ser Glu Arg Pro Ser Leu Asp Gln Ile
405
Ala Ala His Pro Trp Met Leu Gly Thr Glu Gly Ser Val Pro Glu Asn
420
Cys Asp Leu Arg Leu Cys Ala Leu Asp Thr Asp Asp Gly Ala Ser Thr
435
Thr Ser Ser Ser Glu Ser Leu
450
455

```

<210> 6

WO 03/029434

PCT/US02/31948

<211> 323  
 <212> PRT  
 <213> *Xenopus laevis*

<400> 6  
 Met Leu Leu Ser Lys Phe Gly Ser Leu Ala His Ile Cys Asn Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Met Glu His Leu Pro Val Lys Ile Leu Gln Pro Val Lys Val Asp  
 20 25 30  
 Lys Glu Pro Phe Glu Lys Val Tyr Gln Val Gly Ser Val Val Ala Ser  
 35 40 45  
 Gly Gly Phe Gly Thr Val Tyr Ser Asp Ser Arg Ile Ala Asp Gly Gln  
 50 55 60  
 Pro Val Ala Val Lys His Val Ala Lys Glu Arg Val Thr Glu Trp Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Asn Gly Val Met Val Pro Leu Glu Ile Val Leu Leu Lys Lys  
 85 90 95  
 Val Pro Thr Ala Phe Arg Gly Val Ile Asn Leu Leu Asp Trp Tyr Glu  
 100 105 110  
 Arg Pro Asp Ala Phe Leu Ile Val Met Glu Arg Pro Glu Pro Val Lys  
 115 120 125  
 Asp Leu Phe Asp Tyr Ile Thr Glu Lys Gly Pro Leu Asp Glu Asp Thr  
 130 135 140  
 Ala Arg Gly Phe Phe Arg Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys Tyr  
 145 150 155 160  
 Asn Cys Gly Val Val His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Leu Leu Val  
 165 170 175  
 Asp Thr Arg Asn Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala  
 180 185 190  
 Leu Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr  
 195 200 205  
 Ser Pro Glu Trp Val Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala  
 210 215 220  
 Thr Val Trp Ser Leu Gly Val Leu Leu Tyr Asp Met Val Tyr Gly Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Pro Phe Glu Gln Asp Glu Glu Ile Val Arg Val Arg Leu Cys Phe  
 245 250 255  
 Arg Arg Arg Ile Ser Thr Glu Cys Gln Gln Leu Ile Lys Trp Cys Leu  
 260 265 270  
 Ser Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Leu Glu Gln Ile Phe Asp His  
 275 280 285  
 Pro Trp Met Cys Lys Cys Asp Leu Val Lys Ser Glu Asp Cys Asp Leu  
 290 295 300  
 Arg Leu Arg Thr Ile Asp Asn Asp Ser Ser Thr Ser Ser Ser Asn  
 305 310 315 320  
 Glu Ser Leu

<210> 7  
 <211> 313  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 7  
 Met Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Arg Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Asn Asp Leu His Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu  
 20 25 30  
 Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly

WO 03/029434

PCT/US02/31948

```

35          40          45
Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ala Asp Asn Leu Pro Val
50
Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu
65
Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val
85
Ser Ser Asp Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg
100
Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp
115
Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Asp Leu Ala
130
Arg Gly Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn
145
Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp
165
Leu Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Glu Ala Leu
180
Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser
195
Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala
210
Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile
225
Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Lys Gly Gln Val Phe Phe Arg
245
Gln Thr Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Lys Trp Cys Leu Ser
260
Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Ser Phe Glu Glu Ile Arg Asn His Pro
275
Trp Met Gln Gly Asp Leu Leu Pro Gln Ala Ala Ser Glu Ile His Leu
290
His Ser Leu Ser Pro Gly Ser Ser Lys
305
310

```

```

<210> 8
<211> 313
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

```

```

<400> 8
Met Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Ala Pro
1      5      10      15
Cys Asn Asp Leu His Ala Asn Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu
20     25     30
Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly
35     40     45
Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ala Asp Asn Leu Pro Val
50     55     60
Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu
65     70     75     80
Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val
85     90     95
Ser Ser Gly Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg
100    105    110
Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp
115    120    125
Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Glu Leu Ala

```

WO 03/029434

PCT/US02/31948

130 135 140  
 Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn  
 145 150 155 160  
 Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp  
 165 170 175  
 Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu  
 180 185 190  
 Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser  
 195 200 205  
 Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala  
 210 215 220  
 Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile  
 225 230 235 240  
 Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Val Lys Gly Gln Val Tyr Phe Arg  
 245 250 255  
 Gln Arg Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ser  
 260 265 270  
 Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Ser Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro  
 275 280 285  
 Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Ala Thr Ala Glu Ile His Leu  
 290 295 300  
 His Ser Leu Ser Pro Ser Pro Ser Lys  
 305 310

<210> 9  
 <211> 313  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 Met Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Asn Asp Leu His Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu  
 20 25 30  
 Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly  
 35 40 45  
 Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn Leu Pro Val  
 50 55 60  
 Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val  
 85 90 95  
 Ser Ser Gly Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg  
 100 105 110  
 Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp  
 115 120 125  
 Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Glu Leu Ala  
 130 135 140  
 Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn  
 145 150 155 160  
 Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp  
 165 170 175  
 Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu  
 180 185 190  
 Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser  
 195 200 205  
 Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala  
 210 215 220  
 Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile

WO 03/029434

PCT/US02/31948

225                    230                    235                    240  
 Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val Phe Phe Arg  
                          245                    250                    255  
 Gln Arg Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala  
                          260                    265                    270  
 Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro  
                          275                    280                    285  
 Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu Ile His Leu  
                          290                    295                    300  
 His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys  
 305                    310

<210> 10  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> antisense oligonucleotide complementary to the  
 region surrounding the translational start site of  
 HKID-1 mRNA

<400> 10  
 agagcagcat cgcgggcgac ggc                    23

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> antisense oligonucleotide complementary to the  
 region surrounding the translational start  
 site of HKID-1 mRNA

<400> 11  
 agcagcatcg cgggcgac                    18

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 April 2003 (10.04.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/029434 A3

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/395**, 38/00, 47/00, C12N 1/5/09, C07K 16/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/31948
- (22) International Filing Date: 4 October 2002 (04.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/971,791 4 October 2001 (04.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **MILLENNium PHARMACEUTICALS INC.** [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **KAPPELLER-LIBERMAN, Rosana** [BR/US]; 86 Beacon Street, Chestnut Hill, MA 02467 (US); **RUDOLPH-OWEN, Laura, A.** [US/US]; 186 Arborway #1, Jamaica Plain, MA 02130 (US); **MACBETH, Kyle** [US/US]; 65 Worcester Street #3, Boston, MA 02118 (US).
- (81) Designated States (national): AU, 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, GI, 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, MY, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPo patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 16 October 2003

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

WO 03/029434 A3

(54) Title: NOVEL MOLECULES OF THE HKID-1-RELATED PROTEIN FAMILY AND USES THEREOF

(57) Abstract: Novel HKID-1 polypeptides, proteins, and nucleic acid molecules are disclosed. In addition to isolated, full-length HKID-1 proteins, the invention further provides isolated HKID-1 fusion proteins, antigenic peptides and anti-HKID-1 antibodies. The invention also provides HKID-1 nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing a nucleic acid molecule of the invention, host cells into which the expression vectors have been introduced and non-human transgenic animals in which an HKID-1 gene has been introduced or disrupted. Diagnostic, screening and therapeutic methods utilizing compositions of the invention are also provided.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/31948
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 39/395, 38/00, 47/00, C12N 15/09; C07K 16/00 US CL : 435, 69.1, 69.2, 530/387.1; 424/130.1, 146.1; 514/2, 789 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) U.S. : 435, 69.1, 69.2, 183, 194; 530/387.1; 424/130.1, 146.1; 514/2, 789  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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,143,540 A (KAPELLAR et al.) 07 November 2000 (07.11.2000), see entire document.	1-22
Y	EP 0 911 391 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 19 October 1998 (19.10.1998), see entire document.	1-22
A	FELDMAN et al., KID-1, a Protein Kinase Induced by Depolarization in Brain. Journal of Biological Chemistry. 26 June 1998, Vol. 273, No. 26, pages 16535-16543.	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"F"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"
Date of the actual completion of the international search 02 December 2002 (02.12.2002)		Date of mailing of the international search report 09 JUN 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Richard C. Hanson Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/31948

**Continuation of E. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
EAST, STN, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, JAPIO, PATOSWO, PATOSEP, SCISEARCH  
search terms, Kinase, inhibition, regulation, modulation, method, antibody, SEQ ID NO. 1/2

## 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)
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/04	
C 1 2 N 5/10	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 1 2 N 9/12	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 9/12	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, 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, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 カペラーリバーマン, ロザナ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 7, チェストナット ヒル, ビーコン ストリート 8 6

(72) 発明者 ロードルフ - オーウェン, ローラ エイ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 0, ジャマイカ ブレイン, アーボウェイ 1 8 6 ナンバー 1

(72) 発明者 マクベス, カイル  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 1 8, ボストン, ウォーセスター ストリート 6 5 ナンバー 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA10 CA02 CA04 CA11 DA02 EA04 FA02 GA11 GA27  
HA08  
4B050 CC03 DD11 LL01  
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01 BB19 BB40 CA44  
4C084 AA02 AA06 AA13 AA17 BA44 CA18 CA56 DA25 NA14 ZB211  
ZB212 ZB261 ZB271 ZC012 ZC412  
4C085 AA13 AA14 BB01 CC02 DD61 EE01