



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 007 T2** 2006.04.20

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 025 236 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 007.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/06982**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 955 533.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/020747**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.10.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **29.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **27.07.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.04.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/54** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**9722320**      **22.10.1997**      **GB**

(73) Patentinhaber:

**Janssen Pharmaceutica N.V., Beerse, BE**

(74) Vertreter:

**Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman  
Vossius, Dr. Martin Grund, Dr. Georg Schnappauf,  
81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LUYTEN, H., Walter, B-2340 Beerse, BE; PARKER,  
E., Andrew, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB**

(54) Bezeichnung: **HUMANE CHECKPOINTKINASE, HCDS1, ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN**

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

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

## Beschreibung

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0001]** Die Integrität des Genoms ist für eine sich teilende Zelle von grundlegender Bedeutung. Als Antwort auf eine Beschädigung von DNA, sind eukaryontische Zellen auf ein komplexes System von Checkpoint-Kontrollen angewiesen, um den Verlauf des Zellzyklus zu verzögern. Der normale eukaryontische Zellzyklus wird in vier Phasen aufgeteilt (in der Reihenfolge G1, S, G2, M), die mit einer unterschiedlichen Zellmorphologie und biochemischen Aktivität verbunden sind und Zellen, die nicht mehr dem Zellzyklus unterliegen, befinden sich in G0 oder einem nicht zyklusabhängigen Stadium. Wenn sich die Zellen innerhalb des Zellzyklus aktiv verdoppeln, findet die Vervielfältigung von DNA in der S-Phase statt und die aktive Teilung der Zelle findet in der M-Phase statt (siehe allgemein Benjamin Lewin, GENES IV (Oxford University Press, Oxford, GB, Kapitel 36, 1997). Die DNA ist in der eukaryontischen Zelle in aufeinanderfolgenden höheren Organisationsebenen organisiert, die zur Bildung von Chromosomen führen. Die Nichtgeschlechtschromosomen liegen normalerweise in Paaren vor und während der Zellteilung repliziert sich die DNA von jedem Chromosom, so dass sich gepaarte Chromatide bilden (siehe allgemein Benjamin Lewin, GENES IV (Oxford University Press, Oxford, GB, Kapitel 5, 1997).

**[0002]** Checkpointverzögerungen geben Zeit zur Reparatur von beschädigter DNA vor deren Replikation in der S-Phase und vor der Auftrennung der Chromatiden in der M-Phase (Hartwell und Weinert, 1989, Science, 246: 629–634). In vielen Fällen verursachen die Reaktionswege von einem DNA-Schaden einen Arrest, indem die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen gehemmt wird (Elledge, 1997, Science, 274: 1664–1671). In humanen Zellen hängt die durch einen DNA-Schaden induzierte G2-Verzögerung zum großen Teil von der inhibitorischen Phosphorylierung von Cdc2 ab (Blasina et al., 1997, Mol. Cell Biol., 8: 1–11; Jin et al., 1996, J. Cell Biol., 134: 963–970) und ist daher eher auf eine Veränderung der Aktivität der entgegenwirkenden Kinasen und Phosphatasen, die auf Cdc2 wirken, zurückzuführen. Jedoch gibt es keinen Beweis dafür, dass die Aktivität der Enzyme als Antwort auf einen DNA-Schaden wesentlich verändert ist (Poon et al., 1997, Cancer Res., 57: 5168–5178).

**[0003]** Es werden drei unterschiedliche Cdc25-Proteine in humanen Zellen exprimiert. Cdc25A wird insbesondere für den G1-S-Übergang benötigt (Hoffmann et al., 1994, EMBO J., 13: 4302–4310; Jinno et al., 1994, EMBO J., 13: 1549–1556), worin Cdc25B und Cdc25C für den G2-M-Übergang benötigt werden (Gabielli et al., 1996, J. Cell Sci., 7: 1081–1093; Galaktinov et al., 1991, Cell, 67: 1181–1194; Millar et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10500–10504; Nishijima et al., 1997, J. Cell Biol., 138: 1105–1116). Die exakte Verteilung von Cdc25B und Cdc25C während des Verlaufs der M-Phase ist nicht bekannt.

**[0004]** Ein großer Teil unseres gegenwärtigen Wissens über die Checkpoint-Kontrolle stammt von Untersuchungen, in denen Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Spaltheife (*Schizosaccharomyces pombe*) verwendet wurden. Es wurde kürzlich eine Anzahl von Reviews über das gegenwärtige Verständnis von Zellzyklus-Checkpoints in der Hefe und höheren Eukaryonten veröffentlicht (Hartwell & Kastan, 1994, Science, 266: 1821–1828; Murray, 1994, Current Biology, 6: 872–876; Elledge, 1996, Science, 274: 1664–1672; Kaufmann & Paules, 1996, FASEB J., 10: 238–247). In der Spaltheife wurden sechs Genprodukte, rad1<sup>+</sup>, rad3<sup>+</sup>, rad9<sup>+</sup>, rad17<sup>+</sup>, rad26<sup>+</sup> und hus1<sup>+</sup> als Bestandteile sowohl der DNA-Schadens-abhängigen und DNA-Replikations-abhängigen Checkpoint-Pathwaye identifiziert. Zusätzlich wurde bei cds1<sup>+</sup> festgestellt, dass es für den DNA-Replikations-abhängigen Checkpoint erforderlich ist, und bei rad27<sup>+</sup>/chk1<sup>+</sup> wurde festgestellt, dass sie für den DNA-Schadens-abhängigen Checkpoint in der Hefe erforderlich sind.

**[0005]** Mehrere dieser Gene besitzen strukturelle Homologe in der Bäckerhefe und eine weite Konservierung unter Eukaryonten wurde kürzlich nahegelegt, als zwei humane Homologe von *S. pombe* rad3<sup>+</sup>: ATM (Ataxia telangiectasia-mutiert) (Savitsky et al., 1995, Science, 268: 1749–1753) und ATR (Ataxia telangiectasia- und rad3<sup>+</sup>-verwandt) (Bentley et al., 1996, EMBO J., 15: 6641–6651; Cimprich et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2850–2855) und ein humanes Homolog von *S. pombe* rad9<sup>+</sup> (Liebermann et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 13890–13885) kloniert worden sind.

**[0006]** Während vieles über Checkpoint-Proteine und -Gene der Hefe bekannt ist, lässt sich aufgrund dieses Wissens nicht vollständig vorhersagen, ob es korrespondierende humane Gene oder Proteine gibt oder welche Wirkungsrolle sie bei der humanen Zellzykluskontrolle und -Regulation ausüben.

**[0007]** Um neue und wirksamere Behandlungen und Therapeutika für die Linderung der Wirkungen von Krebs zu entwickeln, ist es notwendig, humane Checkpoint-Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren

und Mediatoren für deren Aktivität zu identifizieren.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0008]** Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung eines neuen humanen Checkpoint-Kinase-Gens, hCDS1, dessen Protein und Konstrukte und Verfahren zur Herstellung und Verwendung von hCDS1.

**[0009]** Insbesondere umfasst die vorliegende Erfindung eine Nukleinsäuresequenz, die für hCDS1 kodiert und die aus der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1 besteht. Insbesondere umfasst die Erfindung die Nukleinsäuresequenz von der Position 66 bis 1694 der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1, die in das hCDS1-Protein translatiert wird. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren, Plasmide, Kosmide und dergleichen, welche die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1 enthalten.

**[0010]** Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung Nukleinsäurevektorkonstrukte bereit, welche die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1 enthalten und die zur Expression des Proteins mit dieser Nukleinsäuresequenz fähig sind. Die vorliegende Erfindung umfasst Nukleinsäurevektoren, die zur Transformation von Wirtszellen, seien es eukaryontische oder prokaryontische, geeignet sind, zum Einbau in virale Vektoren geeignet sind oder zur Proteinexpression in vitro geeignet sind. Die vorliegende Erfindung beinhaltet weiter die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1 in der Reihe oder auf andere Weise in Verbindung stehend mit weiteren Nukleinsäuren zur Herstellung von Fusionsproteinprodukten, die mindestens den funktionellen Abschnitt des Proteins enthalten, das durch die Nukleinsäure von SEQ ID NO: 1 kodiert wird. Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Nukleinsäure von SEQ ID NO: 1, die zur Verwendung als eine reine DNA-Transformante zum Einbau und Expression in Zielzellen angepasst ist. Die vorliegende Erfindung stellt auch Antisense-DNA-Molekülformulierungen bereit, die das Komplement sind zu der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1 und Fragmenten davon, seien es komplementäre oder zusammenhänge oder nicht zusammenhängende Teile der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1. Die vorliegende Erfindung stellt auch Zusammensetzungen zum Einbau von modifizierten Nukleotiden oder Rückgratbestandteilen bereit, die für die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1, deren Komplement oder Fragmenten davon kodieren. Solche modifizierten Nukleotide und Nukleinsäuren sind auf dem Gebiet bekannt (siehe z.B. Verma et al., Ann. Rev. Biochem. 67: 99–134 (1998)). Daher umfasst die vorliegende Erfindung modifizierte Nukleinsäuren, die z.B. Internukleotid-Bindungsmodifikationen, Basenmodifikationen, Zuckermolekülmodifikationen oder nicht radioaktive Markierungen, Nukleinsäurekreuzvernetzungen und veränderte Grundgerüste einschließlich PNAs (Polypeptidnukleinsäuren) einschließen.

**[0011]** Die vorliegende Erfindung stellt das neue humane Checkpoint-Kinaseprotein hCDS1 bereit, das aus der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 besteht. Die Erfindung umfasst das hCDS1-Protein, das durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt wurde, und in vivo oder in vitro exprimiert wurde. Die Erfindung umfasst somit das hCDS1-Protein, das durch transformierte Wirtszellen im kleinen oder großen Produktionsmaßstab hergestellt wurde. Die Erfindung umfasst das vollständige hCDS1-Protein, entweder in dessen glykosylierten oder nicht glykosylierten Form, so wie es entweder durch eukaryontische oder prokaryontische Zellen hergestellt wird. Die vorliegende Erfindung stellt ein hCDS1-Protein bereit, das in Säugetier-, Insekten-, Pflanzen-, bakteriellen, Pilz-, oder anderen geeigneten Wirtszellen exprimiert wird. Die vorliegende Erfindung umfasst das hCDS1-Protein, das als ein Fusionsproteinprodukt hergestellt wird und an ein Festträger oder hCDS1-Protein konjugiert ist, das mit einem beliebigen chemischen, radioaktiven, fluoreszierenden, chemilumineszierenden oder auf andere Weise mit nachweisbaren Marker markiert ist. Die vorliegende Erfindung stellt auch hCDS1-Protein bereit, das aus natürlichen Quellen isoliert wurde und in höherer Reinheit vorliegt als jenes, das in der Natur anzutreffen ist. Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Formulierungen von hCDS1-Protein bereit und Formulierungen des hCDS1-Proteins in pharmazeutisch verträglichen Trägern oder Arzneimittelträgern.

**[0012]** Die vorliegende Erfindung umfasst eine beliebige Nukleinsäuresequenz, die für die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 kodiert und die Ausführungsformen dieser Nukleinsäuresequenzen, wie sie in der SEQ ID NO: 1 beschrieben sind, da der Nukleinsäurecode zur Herstellung einer beliebigen Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 kodiert, für den Fachmann vorhersehbar ist.

**[0013]** Die vorliegende Erfindung umfasst Antikörper, die spezifisch an das hCDS1-Protein binden, entweder polyklonale oder monoklonale, die durch Immunisierung eines Säugetiers mit einem Protein mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 oder Fragmenten davon erzeugt werden.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch äquivalente Proteine mit Substitutionen von Aminosäuren in der Sequenz von SEQ ID NO: 2, die als Äquivalent vorhersehbar sind und in Ausführungsformen davon, wie sie für SEQ ID NO: 2 beschrieben sind. Beispielsweise haben die nicht polaren Aminosäuren (mit hydrophoben Seitenketten) Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan, Methionin; die nicht geladenen polaren Aminosäuren Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin, Glutamin; die geladenen polaren Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure; die basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin für den Fachmann funktionell vorhersehbare Wirkungen, wenn sie ersetzt werden. Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch äquivalente Nukleinsäuren, die für solche äquivalenten Proteine und den Ausführungsformen davon, wie sie für SEQ ID NO: 1 beschrieben sind, kodieren.

**[0015]** Die Erfindung stellt auch Verfahren zur Herstellung von hCDS1-Protein bereit, indem rekombinante DNA-Technologien und die geeignete Nukleinsäure, die für das hCDS1-Protein, Fusionsprotein oder Fragmente davon kodiert, verwendet werden. Die Erfindung ermöglicht einen Einbau einer geeigneten Nukleinsäuresequenz in einen zweckmäßigen Expressionsvektor, zusammen mit einem Einbau von beliebigen geeigneten Kontrollelementen, wie einem Promotor und/oder Enhancer, die entweder induzierbar oder konstitutiv exprimiert werden. Die Erfindung ermöglicht die Verwendung von Expressionsvektoren mit oder ohne mindestens einem zusätzlichen selektierbaren Marker oder exprimierbarem Protein. Die Erfindung stellt Verfahren bereit, in denen ein in geeigneter Weise konstruierter Expressionsvektor transformiert wird oder auf andere Weise in eine geeignete Wirtszelle eingeführt wird sowie das Protein, das durch eine solche Wirtszelle exprimiert wird. Daher stellt die Erfindung auch die transformierten Wirtszellen bereit, die zur Herstellung des hCDS1-Proteins, Fusionsproteins oder Fragmenten davon, fähig sind.

**[0016]** Die Entdeckung, dass hCDS1 zusammen mit Cdc25 eine Funktion in dem DNA-Schaden-Checkpoint hat, ermöglicht die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in Verfahren zur therapeutischen Behandlung von Krankheiten, die auf einer abnormalen Funktion des DNA-Schaden-Checkpoints basieren. Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als Therapeutika zur Behandlung von Krebs. Insbesondere ermöglicht die vorliegende Erfindung die spezifische Modifikation des hCDS1-Cdc25-DNA-Schaden-Checkpoints in Zellen.

**[0017]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch Verfahren zum Screening von Testverbindungen auf deren Wirksamkeit, einen Einfluss auf die hCDS1-vermittelte Checkpoint-Funktion von eukaryontischen Zellen zu haben, wobei das Verfahren das In-Kontakt-Bringen einer Testverbindung mit eukaryontischen Zellen und den Nachweis einer Veränderung bei der hCDS1-Expression oder -Funktion umfasst. Daher umfasst die Erfindung weiter ein Verfahren zum Screening, wobei der Nachweis anhand einer Veränderung bei der hCDS1-Expression oder -Funktion erfolgt, indem die hCDS1-mRNA-Produktion analysiert wird oder indem die Expression von hCDS1-Protein analysiert wird. Insbesondere ermöglicht die vorliegende Erfindung das Screening von Kandidatensubstanzen auf deren Wirksamkeit bei der Modifizierung des DNA-Schaden-Checkpoints durch Screening einer Veränderung bei der Cdc25-Phosphorylierung oder Kinase-Aktivität. Durch die erfindungsgemäßen Assays identifizierte Verbindungen oder Substanzen oder Verbindungen, die solchen Verbindungen oder Substanzen entsprechen, können zur Herstellung von pharmazeutischen Therapeutika verwendet werden.

**[0018]** Daher stellt die vorliegende Erfindung in einer Ausführungsform pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, die das hCDS1-Protein, hCDS1-Nukleinsäure und hCDS1-Antisense-Nukleinsäuren umfassen. In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Verbindungen oder Substanzen bereit, die durch die erfindungsgemäßen Assays zur Verwendung als Therapeutikum in pharmazeutischen Formulierungen als geeignet befunden wurden. Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen können weiter chemotherapeutische Agenzien für die Verwendung zur Behandlung von Krebs einschließen oder können in einer Dosierungsform verabreicht werden, die mit der Verabreichung von anderen Antikrebstherapien koordiniert wird. Die vorliegende Erfindung umfasst in einer Ausführungsform daher Verfahren zur kombinierten Chemotherapie unter Verwendung der hCDS1-abgeleiteten Pharmazeutika unabhängig oder in Kombination mit anderen chemotherapeutischen Agenzien und in einer zweiten Ausführungsform als Gemische mit anderen Antikrebstherapeutika zur Einzeldosisverabreichung.

**[0019]** In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird daher eine Nukleinsäure, die für ein hCDS1-Protein mit der in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO: 2) gezeigten Aminosäuresequenz kodiert oder für ein funktionelles Äquivalent des Fragments kodiert, oder ein Biovorläufer von diesen Proteinen bereitgestellt. Vorzugsweise kann die Nukleinsäure ein DNA-Molekül sein, beispielsweise ein genomisches DNA-Molekül und ist bevorzugter ein cDNA-Molekül, sie kann jedoch auch eine RNA sein.

**[0020]** Eine bevorzugte Ausführungsform umfasst eine Nukleinsäure, die für ein hCDS1-Protein kodiert, die

Nukleinsäuresequenz entsprechend den Positionen 66 bis 1694, der in [Fig. 1](#) gezeigten Sequenz (SEQ ID NO: 1), das Komplement davon oder eine Nukleinsäuresequenz, die zur Hybridisierung an eine von diesen Nukleinsäuren unter hoch stringenten Bedingungen fähig ist.

**[0021]** Die hier definierten Nukleinsäuresequenzen können vorteilhaft zur Hybridisierung unter leicht stringenten Bedingungen an Nukleinsäuresequenzen, die sich von Familienmitgliedern ableiten, fähig sein, um Homologe davon zu identifizieren oder um alternativ Nukleinsäuresequenzen von anderen Spezies zu identifizieren.

**[0022]** Für den Fachmann ist bekannt, dass aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen Substitutionen enthalten können, die trotzdem für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren.

**[0023]** Vorteilhafterweise können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in einem Expressionsvektor eingebaut werden und anschließend zur Transformation, Transfektion oder Infektion einer geeigneten Wirtszelle verwendet werden. In einem solchen Expressionsvektor ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure operabel mit einer Kontrollsequenz, wie z.B. einem geeigneten Promotor oder dergleichen, verbunden, um die Expression der erfindungsgemäßen Proteine in einer geeigneten Wirtszelle zu gewährleisten. Der Expressionsvektor kann in vorteilhafter Weise ein Plasmid, Kosmid, Virus oder ein anderer geeigneter Vektor sein. Der Expressionsvektor und die mit dem Vektor transfizierte, transformierte oder infizierte Zielzelle bilden ebenfalls einen Teil der vorliegenden Erfindung. Vorzugsweise ist die Wirtszelle eine eukaryontische Zelle oder eine bakterielle Zelle und ist bevorzugter eine Säugetierzelle oder Insektenzelle. Säugetierwirtszellen sind insbesondere vorteilhaft, da sie posttranslationale Modifikationen an den erfindungsgemäßen exprimierten Proteinen, wie z.B. Glykosylierung oder dergleichen, ermöglichen. Solche Modifikationen verleihen den Proteinen eine optimale biologische Aktivität, die nach deren Isolierung in vorteilhafter Weise in diagnostischen Kits oder dergleichen eingesetzt werden können.

**[0024]** Der Expressionsvektor, der die erfindungsgemäße Nukleinsäure einschließt, kann vorteilhaft in vivo verwendet werden, wie beispielsweise in einer Gentherapie.

**[0025]** In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine transgene Zelle, Gewebe oder Organismus bereitgestellt, die ein Transgen umfassen, das zur Expression des hCDS1-Proteins fähig ist, wobei das Protein die in [Fig. 2](#) (SEQ ID NO: 2) gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines funktionellen Äquivalents oder Biovorläufers oder Fragments davon umfasst. Der Ausdruck "Transgen, das zur Expression fähig ist", wie hier verwendet, bezeichnet eine geeignete Nukleinsäuresequenz, die zur Expression von hCDS1 oder Proteinen mit derselben Funktion und/oder Aktivität führt. Das Transgen kann z.B. eine genomische Nukleinsäure, die von humanen Zellen isoliert wurde oder eine synthetische Nukleinsäure, einschließlich DNA, die in das Genom oder in ein extrachromosomales Stadium integriert wurde, einschließen. Vorzugsweise umfasst das Transgen die Nukleinsäuresequenz, die für die erfindungsgemäßen Proteine, wie sie hier beschrieben sind, kodiert oder ein funktionelles Fragment von dieser Nukleinsäure. Ein funktionelles Fragment von dieser Nukleinsäure soll ein Fragment des Gens bezeichnen, das die Nukleinsäure, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodiert oder ein funktionelles Äquivalent, Derivat oder ein nicht funktionelles Derivat, wie eine dominant-negative Mutante, oder Biovorläufer der Proteine umfasst. Beispielsweise wird es für den Fachmann leicht ersichtlich sein, dass Nukleotid-Substitutionen oder Deletionen unter Einsatz von Routinetechniken, die nicht die Proteinsequenz, die durch diese Nukleinsäure kodiert wird, oder die für ein funktionelles erfindungsgemäßes Protein kodiert, beeinflussen, durchgeführt werden können.

**[0026]** Das durch die transgene Zelle, Gewebe oder Organismus exprimierte hCDS1-Protein oder ein funktionelles Äquivalent oder Biovorläufer von diesem Protein bildet auch einen Teil der vorliegenden Erfindung.

**[0027]** Es wird weiter durch die vorliegende Erfindung ein Antisense-Molekül bereitgestellt, das zur Hybridisierung an die erfindungsgemäße Nukleinsäure fähig ist. Das erfindungsgemäße Antisense-Molekül kann vorteilhaft als ein Arzneimittel oder für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs oder anderen proliferativen Krankheiten verwendet werden.

**[0028]** Die vorliegende Erfindung stellt vorteilhaft auch Nukleinsäuresequenzen aus mindestens 15 Nukleotiden einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Verfügung, und vorzugsweise zwischen 15 bis 50 Nukleotiden. Diese Sequenzen können vorteilhaft als Sonden oder Primer verwendet werden, um eine Replikation oder dergleichen einzuleiten. Solche Nukleinsäuresequenzen können durch Techniken, die auf dem Gebiet gut bekannt sind, wie z.B. rekombinante oder synthetische Mittel, hergestellt werden. Sie können auch in diagnostischen Kits oder dergleichen zum Nachweis des Vorliegens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure verwendet

werden. Diese Tests umfassen allgemein das In-Kontakt-Bringen der Sonde mit der Probe unter hybridisierenden Bedingungen und den Nachweis des Vorliegens einer Duplex- oder Triplex-Bildung zwischen der Sonde und einer beliebigen Nukleinsäure in der Probe.

**[0029]** Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können vorteilhaft unter Verwendung von solchen rekombinanten oder synthetischen Mitteln hergestellt werden, wie z.B. mittels PCR-Klonierungsmechanismen, die im Allgemeinen die Herstellung eines Primerpaars, die ungefähr 15 bis 50 Nukleotide einer Region des Gens umspannen, das kloniert werden soll, das In-Kontakt-Bringen der Primer mit mRNA, cDNA oder genomischer DNA von einer humanen Zelle, das Durchführen einer Polymerasenkettenreaktion unter Bedingungen, bei denen eine Amplifikation der gewünschten Region möglich ist (und, wo notwendig, zuerst die Durchführung eines reversen Transkriptionsschrittes), das Isolieren der amplifizierten Region oder Fragment und das Isolieren der amplifizierten DNA umfassen. Im Allgemeinen sind die hier definierten Techniken auf dem Gebiet bekannt und z.B. beschrieben in Sambrook et al., (Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1989). Humane allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäure können beispielsweise erhalten werden, indem genomische DNA-Bibliotheken von einer Reihe von Individuen, z.B. von unterschiedlichen Populationen, mit einer Sonde oder durch andere genotypische Techniken untersucht werden. Weiter können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und Sonden verwendet werden, um genomische DNA aus Patienten unter Verwendung von auf dem Gebiet bekannten Techniken, z.B. mit Hilfe des Sanger-Didesoxyketten-Terminationsverfahrens, zu sequenzieren, was vorteilhaft einen Nachweis einer Prädisposition eines Patienten für bestimmte proliferative Krankheiten ermöglicht.

**[0030]** Weiter werden in der vorliegenden Erfindung isolierte Proteine mit den Aminosäuresequenzen, wie sie in der [Fig. 2](#) (SEQ ID NO: 2) gezeigt sind, oder mit der Aminosäuresequenz eines funktionellen äquivalenten funktionellen Fragments oder Biovorläufers von diesem Protein neben den monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, die zur Bindung an die Aminosäuresequenzen dieser Proteine oder Fragmente davon fähig sind, bereitgestellt. Der Fachmann wird erkennen, dass die erfindungsgemäßen Proteine konservative Substitutionen, Deletionen oder Insertionen umfassen können, wobei das Protein unterschiedliche Aminosäuren umfasst als solche, die in der [Fig. 2](#) gezeigt sind, wobei solche Substitutionen, Deletionen oder Insertionen nicht die Aktivität der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Fähigkeit zur Interaktion in dem humanen Zellzyklus-Checkpoint-Pathway beeinflussen.

**[0031]** Bevorzugte Fragmente umfassen solche, die ein Epitop der erfindungsgemäßen Proteine umfassen. Die Epitope können beispielsweise unter Verwendung der Peptid-Scanning-Techniken bestimmt werden, wie sie von Geysen et al., Mol. Immunol., 23: 709–715 (1986), beschrieben wurden.

**[0032]** Die erfindungsgemäßen Antikörper können durch übliche Verfahren, die für den Fachmann bekannt sind, hergestellt werden. Monoklonale Antikörper können mittels konventioneller Hybridom-Technologie, wie sie von Kohler F. und Milstein C. (1985), Nature 256, 495–497, beschrieben wurde, hergestellt werden. Polyklonale Antikörper können auch mittels konventioneller Technologie, wie sie für den Fachmann bekannt ist, hergestellt werden und die das Animpfen eines Wirtstieres, wie z.B. eine Maus, mit einem erfindungsgemäßen Protein oder Epitop und die Gewinnung des Immuserums umfassen. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Fragmente von ganzen Antikörpern, die ihre Bindungsaktivität erhalten, wie z.B. Fv-, F(ab')- und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente und Einzelketten-Antikörper.

**[0033]** Idealerweise sind die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder Proteine Bestandteil einer pharmazeutischen Zusammensetzung zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Lösungsmittel oder Arzneimittelträger dafür. Die pharmazeutische Zusammensetzung, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthält, kann beispielsweise in der Gentherapie verwendet werden. Solche Nukleinsäuren können gemäß der Erfindung nackt oder verpackt in Proteinkapseln, Lipidkapseln, Liposomen, Membran-basierenden Kapseln, einem Virusprotein, einem ganzen Virus, Zellvektoren, bakteriellen Zellwirten, geänderten Säugetierzellwirten und anderen geeigneten Verabreichungsmittel dieser Art verabreicht werden.

**[0034]** Weiter wird durch die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweis des Vorliegens oder Fehlens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einer biologischen Probe bereitgestellt, wobei das Verfahren umfasst: a) In-Kontakt-Bringen der Probe mit einer Sonde, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder Sonde umfasst, unter hybridisierenden Bedingungen und b) Nachweis des Vorliegens einer Hybridisierung, z.B. durch das Vorliegen einer Duplex- oder Triplex-Bildung zwischen der Sonde und einer beliebigen Nukleinsäure, die in der Probe vorliegen. Die erfindungsgemäßen Proteine können auch nachgewiesen werden durch a) In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem Antikörper gegen ein Epitop eines erfindungsgemäßen Proteins unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Antigenkomplexes ermöglichen, b) Kontrollieren des Vorliegens ei-

nes Antigen-Antikörperkomplexes.

**[0035]** Kits zum Nachweis der Nukleinsäuren und Proteine werden auch von der vorliegenden Erfindung bereitgestellt. Ein Kit zum Nachweis des Vorliegens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einer biologischen Probe kann umfassen (a) Mittel zum In-Kontakt-Bringen der Probe mit einer Sonde, die eine Nukleinsäure umfasst und einer erfindungsgemäßen Sonde und Mittel zum Nachweis des Vorliegens einer Duplex- oder Trip-lex-Bildung zwischen der Sonde und einer Nukleinsäure, die in der Probe vorliegt.

**[0036]** Gleichermaßen kann ein Kit zum Nachweis des Vorliegens eines erfindungsgemäßen Proteins in einer biologischen Probe umfassen (a) Mittel zum In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem Antikörper gegen ein Epitop eines erfindungsgemäßen Proteins unter Bedingungen, die die Bildung eines Antikörper-Proteinkomplexes ermöglichen und Mittel zum Kontrollieren der Probe auf das Vorliegen eines Protein-Antikörperkomplexes.

**[0037]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bestimmen, ob eine Verbindung ein Inhibitor oder ein Aktivator der Expression oder Aktivität der Proteine des humanen Zellzyklus-Checkpoint-Pathways ist, wobei das Verfahren das In-Kontakt-Bringen einer Zelle, die die Proteine in diesem Pathway exprimiert, mit der Verbindung und das Vergleichen der Expressionsspiegel der Proteine des Checkpoint-Pathways von der Zelle gegenüber einer Zelle, die nicht mit dieser Verbindung in Kontakt gebracht worden ist, umfasst. Beliebige identifizierte Verbindungen können dann vorteilhaft als ein Arzneimittel oder für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs oder von proliferativen Krankheiten verwendet werden. Alternativ können die Verbindungen auch in einer pharmazeutischen Zusammensetzung zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Verdünnungsmittel oder Arzneimittelträger dafür enthalten sein. Es können in vorteilhafter Weise beliebige Verbindungen, die als Inhibitor des Zell-Checkpoint-Pathways identifiziert wurden, in einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen eingeschlossen sein, zusammen mit einem cytotoxischen Agens wie z.B. einem DNA-schädigenden chemotherapeutischen Agens und einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Verdünnungsmittel oder Arzneimittelträger davon. Der humane Zellzyklus-Checkpoint-Inhibitor kann daher die chemotherapeutische Wirkung der beispielsweise in einer Antikrebstherapie verwendeten cytotoxischen Agenzien verstärken.

**[0038]** Es wird auch durch die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Screening von Kandidatensubstanzen für eine Antikrebstherapie bereitgestellt, wobei das Verfahren umfasst a) Bereitstellen eines erfindungsgemäßen Proteins, das eine Kinase-Aktivität besitzt, zusammen mit einem Substrat für das Protein unter Bedingungen, bei denen die Kinase auf das Substrat wirkt, b) In-Kontakt-Bringen des Proteins und Substrats mit einer Kandidatensubstanz, c) Messen der Höhe eines Anstiegs oder Abfalls bei der Kinase-Aktivität des Proteins und d) Selektionieren einer Kandidatensubstanz, die einen Abfall oder einen Anstieg der Aktivität bewirkt. Eine solche Kandidatensubstanz kann auch als ein Arzneimittel oder für die Herstellung von einem Arzneimittel zur Behandlung von Krebs oder anderen solchen proliferativen Zellkrankheiten verwendet werden.

**[0039]** Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zum Identifizieren von anderen Proteinen, die in dem Zell-Checkpoint-Pathway aktiv sind, wobei das Verfahren umfasst: a) In-Kontakt-Bringen eines Zellextrakts mit einem Antikörper gegen ein Epitop von einem erfindungsgemäßen Protein unter geeigneten Bindungsbedingungen, b) Identifizieren eines Antikörper-Proteinkomplexes und c) Analysieren des Komplexes, um ein an den Antikörper gebundenes Protein oder ein anderes als das erfindungsgemäße Protein zu identifizieren.

**[0040]** Ein anderes Verfahren zum Identifizieren von Proteinen, die in dem Zell-Checkpoint-Pathway beteiligt sind, verwendet ein Zwei-Hybridsystem, das in Hefe von Chien et al., supra, entwickelt worden ist (1991). Diese Technik basiert auf einer funktionellen Wiederherstellung eines Transkriptionsfaktors, der ein Reporter-Gen aktiviert. Insbesondere umfasst die Technik die Bereitstellung einer geeigneten Wirtszelle mit einem DNA-Konstrukt, das ein Reporter-Gen umfasst, unter der Kontrolle eines Promotors, der durch einen Transkriptionsfaktor mit einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungsdomäne reguliert wird; die Expression einer ersten Hybrid-DNA-Sequenz, die für eine erste Fusion von einem Fragment oder eine vollständige erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodiert und der DNA-Bindungsdomäne oder der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors in der Wirtszelle; die Expression von mindestens einer zweiten Hybrid-DNA-Sequenz, die für vermeintliche zu untersuchende Bindungsproteine kodiert, zusammen mit der DNA-Bindungsdomäne oder Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors, der nicht in der ersten Fusion enthalten ist, in der Wirtszelle; den Nachweis einer Bindung des zu untersuchenden Proteins mit einem erfindungsgemäßen Protein durch Nachweis der Herstellung eines Reporter-Genprodukts in der Wirtszelle; gegebenenfalls Isolieren der zweiten Hybrid-DNA-Sequenzen, die für das Bindungsprotein kodieren. In einer Ausführungsform von diesem Aspekt der Erfindung kann das Verfahren umfassen:

(a) Konstruktion von mindestens zwei Nukleotidvektoren, wobei der erste von ihnen ein Nukleotidsegment umfasst, das für eine DNA-Bindungsdomäne von GAL4-Protein kodiert, die operabel an eine Nukleinsäuresequenz gebunden ist, die für ein erfindungsgemäßes Protein kodiert, und der zweite Vektor eine Nukleotidsequenz umfasst, die für eine Proteinbindungsdomäne von GAL4 kodiert, die an eine Nukleotidsequenz gebunden ist, die für ein zu testendes Protein kodiert;

(b) Co-Transformation dieser Vektoren in eine Hefezelle, die für eine Transkription von Genen, die für Galaktose-metabolisierende Proteine kodieren, defizient ist, wobei eine Interaktion zwischen dem Testprotein und dem erfindungsgemäßen Protein zu einer Transkription von Galaktose-metabolisierenden Genen führt.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0041]** Die Erfindung kann genauer unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele und den anhängenden Figuren verstanden werden:

**[0042]** [Fig. 1](#) zeigt die Nukleotidsequenz von hCDS1-cDNA (SEQ ID NO: 1), worin die Reste 66–1694 die kodierende Region sind und beschreibt die 3'- und 5'-nichttranslatierten Regionen (UTRs). Die Initiations- und Terminations-Codons sind in Fettschrift gezeigt.

**[0043]** [Fig. 2](#) zeigt die davon abgeleitete Aminosäuresequenz von hCDS1 (SEQ ID NO: 2).

**[0044]** [Fig. 3](#) zeigt das Aminosäuresequenz-Alignment von hCDS1 und *S. pombe* *cds1*, das unter Verwendung des CLUSTALW-Alignment-Programms durchgeführt wurde und unter Verwendung des GENEDOC-Programms ausgewertet wurde. Reste, die schwarz schattiert sind, sind zwischen den beiden Proteinen identisch und Reste, die grau schattiert sind, sind ähnlich.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0045]** Die vorliegende Erfindung umfasst die Isolierung und Charakterisierung eines neuen humanen Checkpoint-Kinasegens und ein Protein, das als hCDS1 bezeichnet wird. Das hCDS1-Gen und -Protein zeigt einige Ähnlichkeit mit einem homologen Gen und Protein, das in *S. pombe* vorhanden ist.

**[0046]** Das *S. pombe* *cds1*<sup>+</sup>-Gen wurde identifiziert durch dessen Fähigkeit eine DNA-Polymerase- $\alpha$ -Mutante zu komplementieren (Murakami & Okayama, 1995, *Nature*, 374: 817–819). *S. pombe* *cds1* war auch fähig die Hydroxyharnstoff-Sensitivität (DNA-Replikations-abhängiger Checkpoint) von *rad1*-, *rad3*- und *rad9*-Mutantenstämmen von *S. pombe* zu unterdrücken, nicht jedoch die UV-Sensitivität (DNA-Schadens-abhängiger Checkpoint). Dies zeigt, dass *cds1* von *S. pombe* dessen Checkpoint-Funktion während der DNA-Synthese ausübt.

**[0047]** *cds1* von *S. pombe* ist eine vermeintliche Protein-Kinase, die zu 70% ähnlich mit dem Checkpoint-Gen RAD53 von *S. cerevisiae* ist. In *S. cerevisiae* sind die DNA-Schadens- und DNA-Replikations-abhängigen Checkpoints genetisch auf der Nachweisebene von DNA-Läsionen getrennt. Die zwei Pathways führen dann zur Rad53-Protein-Kinase, die im Wesentlichen als ein Verstärker in dem Signaltransduktionsweg wirkt. Dies scheint in *S. pombe* nicht der Fall zu sein, in dem dieselben Proteine bei dem Nachweis sämtlicher Arten von Läsionen beteiligt sind, die Transkription des Signals jedoch auf getrennten Wegen stattfindet, in denen unterschiedliche Protein-Kinasen beteiligt sind; *cds1* von *S. pombe* für den DNA-Replikations-abhängigen Checkpoint und Chk1/Rad27 für den DNA-Schadens-abhängigen Pathway. Es ist nahegelegt worden, dass eine S-Phasen-spezifische Aktivierung der *cds1*-Kinase einen Subpathway der Checkpoint-Antwort in *S. pombe* festlegen kann (Lindsay et al., 1998, *Genes and Development*, 12: 382–395).

**[0048]** *cds1* von *S. pombe* kann über eine Interaktion mit einer DNA-Polymerase  $\alpha$  wirken, um das Fortschreiten der DNA-Replikation oder die Integrität der Replikationskomplexe zu kontrollieren. Es gibt in *Drosophila* Hinweise für eine Kinase mit dem passenden Molekulargewicht, die mit DNA-Polymerase  $\alpha$  assoziiert ist (Peck et al., 1993, *B. B. R. C.*, 190: 325–331). Alternativ kann sie über eine Phosphorylierung von p107<sup>wee1</sup>, in analoger Weise zu Chk1 wirken, was unmittelbar die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen der G1/S-Phase beeinflusst.

**[0049]** Viele der Verfahren und Materialien zur Durchführung der grundlegenden molekularen biologischen Manipulation, wie sie in den Beispielen unten beschrieben worden sind, sind für den Fachmann bekannt und können in Literaturstellen wie Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Berger et al., *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Band 152, Academic Press, Inc., (1987); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co.,

Inc. (1986); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 2. Ausgabe, John Wiley & Sons, (1992); Goddard Gene Expression Technology, Methods in Enzymology, Band 185, Academic Press, Inc., (1991); Guthrie et al., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Band 194, Academic Press, Inc., (1991); McPherson et al., PCR Volume 1, Oxford University Press, (1991), gefunden werden.

**[0050]** Die Erfindung mit ihren vielen Aspekten kann leichter unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele verstanden werden.

#### Beispiel 1 Isolation von hCDS1

**[0051]** Die Isolation von hCDS1 begann mit einer Suche nach Sequenzen ähnlich denen von *cds1*<sup>+</sup> von *S. pombe* unter Verwendung des TBLASTN-Programms. Eine humane exprimierte Sequenzmarkierung (EST Nr. 864164) wurde in der geschützten LifeSeq<sup>®</sup>-Datenbank (Incyte Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, CA, USA) identifiziert. Eine Sequenzanalyse des 1,3 kb-Inserts zeigte ein unvollständiges offenes Leseraster, das ähnlich dem von *cds1* von *S. pombe* war. Ungefähr 650 Nukleotide einer neuen 5'-DNA-Sequenz wurden durch 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends; schnelle Amplifikation von cDNA-Enden) unter Verwendung einer humanen plazentalen Marathon-Ready-cDNA (Clontech) gemäß den Anweisungen des Herstellers erhalten.

**[0052]** Die zwei hCDS1-Gen-spezifischen Primer, die für überlappende PCR (Polymerasenkettenreaktion)-Reaktionen verwendet wurden, waren GSP3 5'-TTTTGCTGATGATCTTTATGGCTAC-3' (SEQ ID NO.: 3) und GSP4 5'-CACAGGCACCACTTCCAAGAGTTTT-3' (SEQ ID NO.: 4). Anschließend wurde ein vollständiges ORF für hCDS1 von einer humanen SK-N-MC-Neuroblastom-cDNA-Bibliothek unter Verwendung der PCR-Primer 5'-GGGCTCGAGAGCAGCGATGTCTCGGGAGTCGGATGT-3' (SEQ ID NO.: 5) und 5'-GGCGGATCCTCGAGTCACAACACAGCAGCACACAC-3' (SEQ ID NO.: 6) amplifiziert. Das Amplifikationsprodukt wurde dann in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) kloniert und es wurde die DNA-Sequenz bestimmt.

**[0053]** Die Nukleinsäuresequenz von hCDS1 zeigte eine 47,8%-ige Identität zu dem *cds1*<sup>+</sup> von *S. pombe* auf der DNA-Ebene. Es waren Terminations-Codons in allen drei Leserastern in den 120 Nukleotiden unmittelbar 5' zu dem vermeintlichen hCDS1-Insertionscodon vorhanden, was darauf hindeutet, dass die vollständige kodierende Region isoliert worden ist. Bei Teilen der Sequenz wurde auch gefunden, dass sie zu Teilsequenzen passen, die in den NCBI-Datenbanken gefunden wurden, EST AA285249, genomische Sequenz H55451 und das 54-Basenpaarfragment H55698.

**[0054]** Das identifizierte humane Gen und die Vektoren, die für die hCDS1-Nukleinsäuresequenz kodieren, wurden als Plasmid hCDS1 ORF/pCR-Blunt mit der Hinterlegungsnummer LMBP 3708; als Plasmid hCDS1 5'RACE-Fragment/pGEM-Easy mit der Hinterlegungsnummer LMBP 3710 und als Plasmid hCDS1-3'-Fragment-Incyte-Klon 864164/pSPORT mit der Hinterlegungsnummer LMBP 3709 bei den Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) am Laboratorium Voor Moleculaire Biologies-Plasmidencollecte (LMBP) 32, B-9000 Gent, Belgien gemäß den Anforderungen des Budapestervertrags vom 28. April 1997 hinterlegt.

**[0055]** Das Gewebeexpressionsprofil von hCDS1 wurde mit mehreren Northern-Blots von Geweben (Clontech) und einem Northern-Blot mit einer Krebszelllinie (Clontech) untersucht, die mit dem hCDS1-ORF als Sonde analysiert wurden. Es wurde ein einzelnes Transkript von ungefähr 2,1 kb gefunden. Die Expression war bei Verwendung von konventionellen Northern-Blot-Hybridisierungsbedingungen in allen normalen untersuchten humanen Geweben nicht nachweisbar. Jedoch wurde festgestellt, dass die Expression in sämtlichen untersuchten Krebszelllinien stark erhöht war.

**[0056]** Das hCDS1-Gen war auf dem Chromosom 22q11.2-q12 lokalisiert worden, was anhand des vollständigen ORF als eine Sonde für FISH (Fluoreszenz-in situ-Hybridisierungs)-Analyse bestimmt wurde. Die Hybridisierungswirksamkeit betrug ungefähr 62% und es wurden keine anderen Loci bei den verwendeten Bedingungen nachgewiesen.

**[0057]** Kurz gesagt wurden Lymphozyten, die aus humanem Blut isoliert wurden, in  $\alpha$ -Minimal-Essential-Medium (MEM) kultiviert, das mit 10% fötalem Kälberserum und Phytohaemagglutinin (PHA) ergänzt war, bei 37°C für 68–72 Stunden kultiviert. Die Lymphozytenkulturen wurden mit BrdU (0,18 mg/ml, Sigma) behandelt, um die Zellpopulation zu synchronisieren. Die synchronisierten Zellen wurden dreimal mit Serum-freiem Medium gewaschen, um den Block aufzuheben und bei 37°C für 6 Stunden in  $\alpha$ -MEM mit Thymidin (2,5  $\mu$ g/ml, Sigma) rekultiviert. Die Zellen wurden geerntet und die Objektträger wurden unter Verwendung von Standardverfahren, einschließlich einer hypotonen Behandlung, Fixierung und Lufttrocknung präpariert. DNA-Fragmente, die das vollständige ORF von hCDS1 enthalten, wurden Gel-gereinigt und mit dATP unter Verwendung des

BRL-BioNick-Markierungs-Kits biotiniliert (15°C, 1 Stunde; Heng et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9509–9513).

**[0058]** Die Objektträger wurden dann bei 55°C für eine Stunde gebacken und die Objektträger wurden nach einer RNase-Behandlung in 70% Formamid in 2 × SSC für 2 Minuten bei 70°C denaturiert, gefolgt von einer Dehydrierung mit Ethanol. Die Sonden wurden bei 75°C für 5 Minuten in einem Hybridisierungsmix, der aus 50% Formamid und 10% Dextransulfat besteht, denaturiert. Die Sonden wurden auf die denaturierten chromosomalen Objektträger geladen. Nach einer Übernacht-Hybridisierung wurden die Objektträger gewaschen und nachgewiesen. FISH-Signale und das DAPI-Bandenmuster wurden getrennt aufgezeichnet, indem photographische Abbildungen gemacht wurden und die Zuordnung der FISH-Mapping-Daten mit chromosomalen Banden wurde durch eine Überbelichtung von FISH-Signalen mit DAPI-Banden-Chromosomen erreicht (Heng & Tsui, 1994, Methods in Mol. Biol., 33: 35–49).

#### Beispiel 2 Charakterisierung von hCSD1-Protein

**[0059]** Die Nukleinsäuresequenz der hCDS1-cDNA sagt ein Translationsprodukt mit 543 Aminosäuren mit einem ungefähren Molekulargewicht von 61 kDa voraus. Dies entspricht fast dem tatsächlichen Molekulargewicht des endogenen Cds1-Proteins in HeLa-Zellen. Das vorhergesagte hCDS1-Protein ist zu 28% identisch mit dem Cds1-Protein von *S. pombe*, zu 28% identisch mit RAD53 und zu 27% identisch mit der DUN1-Kinase von *S. cerevisiae*. Ein Sequenz-Alignment von diesen tatsächlichen Homologen zeigt mehrere Regionen mit einer Sequenzähnlichkeit außerhalb der Kinasedomäne einschließlich einer Konservierung der Fork Head-assoziierten Domäne (Hoffmann et al., 1995, Trends Biochem. Sci., 20: 347–9). Das humane Protein zeigt dieselbe Gesamtstruktur wie Cds1 von *S. pombe* und DUN1 von *S. cerevisiae* und es fehlt die lange C-terminale Verlängerung, die in RAD53 vorhanden ist. Eine Northern-Blot-Analyse mit hCDS1 ergab ein einzelnes Transkript von ungefähr 2,2 kb, das in den Hoden und in 8 untersuchten humanen Krebsproben exprimiert wurde.

**[0060]** Kurz gesagt wurden 2 Northern-Blots mit multiplen Geweben (Clontech) und ein Northern-Blot von einer Krebszelllinie (Clontech) mit einer cDNA-Sonde auf hCDS1 hybridisiert. Die Sonde entspricht dem vollständigen ORF wie oben beschrieben. Die Blots wurden bei einer hohen Stringenz gewaschen (0,1 × SSC, 0,1% SDS, 50°C, 2 × 20 Min.) und unter Verwendung eines Kodak X-OMAT-Autoradiographiefilms mit Intensivierungsscreens bei –70°C belichtet.

#### Beispiel 3 Cdc25-Gesamtaktivitäts-Assay

**[0061]** Die Möglichkeit, dass eine Dephosphorylierung von Cdc2 bei Vorliegen eines DNA-Schadens herunterreguliert wird, erforderte einen Assay, um die Analyse der Gesamtaktivität von Cdc25 zu ermöglichen. In der Gegenwart von EDTA wurde festgestellt, dass Cdc2/Cyclin B aus asynchronen HeLa-Zellextrakten spontan inaktiv wurde.

**[0062]** Kurz gesagt wurden Zellen in eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris, pH 7,4, der 2 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 5 µg/ml Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin enthält) lysiert. Lysate wurden durch Zentrifugation bei 10 000 × g für 10 Minuten geklärt und die Proteinkonzentration der Überstände wurde unter Verwendung des Lowry-Assays bestimmt. Es wurden 10 mM EDTA zu den Überständen (100 µg in 60 µl) zugegeben und die Reaktion wurde durch Inkubation bei 30°C gestartet. Bei bestimmten Assay-Intervallen wurde die Aktivität von Cdc2/Cyclin B durch Messung der in den Anti-Cyclin-B-Immünpräzipitaten vorhandenen Histon-H1-Kinase-Aktivität gemessen (Blasina et al., supra). Für Immunoblots wurden 400 µg Zelllysate unter Verwendung von Anti-Cyclin B-Antikörper immunpräzipitiert und auf einem 11%-Acrylamid-SDS-Gel aufgelöst. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das PSTAIRE-Motiv von Cdc2 verwendet, um die unterschiedlichen Phosphoformen von Cdc2 nachzuweisen.

**[0063]** Die Aktivierung korreliert mit dem Verlust der inhibierten, phosphorylierten Form von Cdc2, die als die langsamere migrierende Spezies in SDS-PAGE-Gelen sichtbar ist. Die Aktivierung wurde durch Vanadat, einem Inhibitor von Cdc25 und anderen Tyrosin-Phosphatasen, verhindert. Darüber hinaus verringerte eine Immundepletion mit Cdc25C-spezifischen Antiseren zum großen Teil eine Aktivierung von Cdc2/Cyclin B. Es gab keinen Anstieg bei den Cdc2- oder Cyclin B-Proteinspiegeln, und die Phosphorylierung durch WEE1 und Myt1 wurde durch die Gegenwart von 10 mM EDTA blockiert. Diese Ergebnisse zeigen daher, dass die Aktivierung von Cdc2 das Ergebnis einer Dephosphorylierung war. In Lysaten von asynchronen HeLa-Zellen reicht die endogene Cdc25-Phosphatase-Aktivität zur Dephosphorylierung aus und aktiviert mehr als 80% des verfügbaren Cyclin B/Cdc2 in 30 Minuten. Eine Analyse von Lysaten von HeLa-Zellen, in denen die DNA durch Bestrahlung mit 10 Gy  $\gamma$ -Strahlung für eine Stunde vor der Ernte beschädigt wurde, zeigte eine signifikante Verringerung

der Aktivierungsrate von Cdc2, so dass weniger als 25% des verfügbaren Cdc2/Cyclin B während der 30-minütigen Inkubation aktiviert war. Die Menge von Cdc2/Cyclin B in dem Komplex war nicht signifikant verändert und war durch den Zusatz von exogenem GST-Cdc25 im gleichen Maße aktiviert wie Kontroll-Cdc2/Cyclin B. Eine Bestrahlung mit 10 Gy führte zu einer mehr als 3-fachen Verringerung der Cdc2-Dephosphorylierungsrate in den 10 untersuchten Zeitverläufen. Wenn die Inaktivierung von Cdc25, die oben gemessen wurde, Teil der DNA-Schaden-Checkpoint-Antwort in humanen Zellen ist, dann könnte erwartet werden, dass experimentelle Bedingungen, die den DNA-Schadens-Checkpoint übergehen, die Strahlungs-induzierte Inhibition von Cdc25 blockieren.

#### Beispiel 4 DNA-Schaden-Checkpoint-Wirkung von hCSD1

**[0064]** Die DNA-Schadensantwort in einer Vielfalt von Zellen ist dafür bekannt, verschiedene verwandte Kinasen, die strukturell mit PI-3-Kinasen verwandt sind, zu benötigen. Zumindest bei einem Mitglied der Familie, DNA-Protein-Kinase, wurde gezeigt, dass sie sensitiv ist gegenüber Wortmannin *in vitro* (Hawley et al., 1996, *Genes and Dev.*, 10: 2383–8; Hartley et al., 1995, *Cell*, 82: 849–856). Daher wurde die Möglichkeit, dass eine Wortmannin-sensitive Kinase stromaufwärts auf die Strahlungs-induzierte Verzögerung beim M-Phaseneintritt wirkt, getestet (Price et al., 1996, *Cancer Research*, 56: 246–250). HeLa-Zellen können in der M-Phase durch Nocodazol arretiert werden. Eine Bestrahlung führt zu einer Verzögerung der Zellen in G2 vor dem Nocodazol-sensitiven M-Phasenblock. Daher ist es durch Zählen des mitotischen Index von Zellen, die in Nocodazol kultiviert sind, möglich, zu bestimmen, ob ein Eintritt in die Mitose verzögert worden ist. Kontrollzellen, die in der Gegenwart von Nocodazol für 14 Stunden kultiviert wurden, enthielten 60% mitotische Zellen, wobei die Gegenwart von Wortmannin nur wenig Wirkung auf diese Zahl hatte. Jedoch verringerte eine Bestrahlung die Anzahl von Zellen, die den Nocodazol-Blockpunkt erreichten, auf lediglich 10%. Im Gegensatz dazu zeigte eine Bestrahlung in der Gegenwart von Wortmannin nur eine schwache Wirkung. Diese Ergebnisse zeigen, dass Wortmannin den DNA-Schadens-Checkpoint in G2 in HeLa-Zellen übergeht.

**[0065]** Die Wirkungen von Wortmannin auf eine Strahlungs-induzierte Inaktivierung von Cdc25 wurden dann getestet. Wortmannin hatte nur eine geringe Wirkung auf die Aktivierung von Cdc2/Cyclin B in Extrakten, die von nicht-bestrahlten Kulturen hergestellt wurden, allerdings verringerte es in großen Maßen den Strahlungs-induzierten Abfall bei der Cdc25-Aktivität.

**[0066]** Ein Strahlungs-induzierter G2-Checkpoint wird auch in Zelllinien übergangen, die vom Patienten mit der genetischen Krankheit Ataxia telangiectasia stammen. Ataxia telangiectasia-Mutantenzellen besitzen nach einer Aussetzung gegenüber vielen jedoch nicht allen DNA-schädigenden Agenzien keine G1- und G2-Checkpoints (Canman et al., 1994, *Cancer Research*, 54: 5054–5058). Die fehlende Fähigkeit von AT-defizienten Zellen G1 zu verzögern, korreliert mit der fehlenden Fähigkeit p53 hochzuregulieren (Kastan et al., 1992, *Cell*, 71: 587–589) und mit der fehlenden Fähigkeit cAb1 zu phosphorylieren und aktivieren (Baskaran et al., 1997, *Nature*, 387: 516–519; Shafman et al., 1997, *Nature*, 387: 520–523). Die molekulare Basis für die fehlende Fähigkeit G2 zu verzögern ist nicht bekannt. AT-defiziente Zellen zeigen stark verminderte Antworten auf Agenzien, die chromosomale Brüche erzeugen, wie z.B. ionisierende  $\gamma$ -Strahlen. Bemerkenswerterweise weisen AT-defiziente Zellen beinahe normale Antworten nach der Basenbeschädigung auf, die durch eine Bestrahlung mit einer UV-Quelle erzeugt wurde (Canman et al., 1994, *Cancer Research*, 54: 5054–5058; Painter et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7315–7317; Zampetti-Bosseler et al., 1981, *Int. J. Radiat. Biol.*, 39: 547–558). Die Wirkungen von UV- und  $\gamma$ -Bestrahlung auf die Cdc25-Aktivität von AT-plus- und AT-minus-SV40-transformierten humanen Fibroblastenzelllinien wurde getestet. AT-Minus-Zellen antworten auf eine UV-Bestrahlung mit einer starken Verringerung der Rate mit der Cdc2 dephosphoryliert ist. Im Gegensatz dazu hatte eine  $\gamma$ -Bestrahlung nur eine schwache Wirkung auf die Dephosphorylierungsrate von Cdc2. In AT-Plus-Zellen war die Dephosphorylierungsrate nach einer ionisierenden Bestrahlung oder UV-Bestrahlung signifikant verringert. Diese Daten zeigen, dass das ATM-Genprodukt für die effiziente Inaktivierung von Cdc25 nach einer  $\gamma$ -Bestrahlung erforderlich ist und zeigt eine Korrelation zwischen der Inaktivierung von Cdc25 und dem verzögerten Einleiten der M-Phase nach einem DNA-Schaden.

**[0067]** Mediatoren der Checkpoint-abhängigen Inaktivierung von Cdc25 in humanen Zellen sind exzellente Ziele zur Herstellung von Therapeutika oder therapeutischen Dosierungsformen, die eine Antikrebsbehandlung fördern werden und Nebenwirkungen auf normale Zellen verringern werden.

**[0068]** Um biochemische Charakterisierung von hCDS1 zu ermöglichen, wurde 6his-hCDS1 in Insektenzellen exprimiert, affinitätsgereinigt und in HeLa-Zellextrakten in der Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems inkubiert. EDTA wurde zugegeben, um Kinasen in den Extrakt zu inhibieren und die Dephosphorylierungsrate und Aktivierung von Cdc2/Cyclin B wurde kontrolliert.

**[0069]** Kurz gesagt wurden rekombinante Viren, die für 6his-hCDS1, 6his-Chk1, 6his-Cdc2 und GST-Cdc25C kodieren, unter Verwendung des Bac-to-Bac-Expressionssystems von Gibco/BRL hergestellt. 6his-Fusionsproteine wurden entsprechend dem Verfahren, das von Kumagai et al., (1995), Mol. Biol. Cell, 6: 199–213, beschrieben wurde, aufgereinigt. GSH-Sepharose-Beads wurden für 15 Minuten in Sf9-Extrakten inkubiert; die Beads wurden durch Zentrifugation gesammelt und dreimal mit Lysepuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% NP40, 5% Glycerin, 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol und Protease-Inhibitoren) gewaschen. Die Beads wurden dreimal mit Kinase-Assay-Puffer (50 mM Tris, pH 7,4, 10 mM  $MgCl_2$ ) vor den Phosphorylierungsreaktionen oder dreimal mit Phosphatase-Assay-Puffer (50 mM Imidazol, pH 7,4, 5 mM EDTA und 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) vor den Phosphatase-Assays gewaschen.

**[0070]** Sowohl 6his-Chk1 als auch 6his-hCDS1 führten zu einer signifikanten Verringerung der Aktivierung von Cdc2/Cyclin B in diesen Assays. Die verringerte Aktivierung von Cdc2 war dosisabhängig und erforderte ATP. Eine Bestätigung, dass Cdc2 nicht irreversibel durch 6his-Chk1 oder 6his-hCDS1 inhibiert war, wurde durch die Aktivierung gezeigt, die folgte, wenn überschüssiges GST-Cdc25C nach einer Kinasebehandlung zugegeben wurde. Daher können sowohl 6his-hCDS1 als auch 6his-Chk1 die Strahlungs-induzierte Herunterregulation von Cdc25, wie sie in Extrakten beobachtet wird, nachahmen. Diese Experimente verwendeten He-La-Zelllysate, die durch Zentrifugation geklärt worden sind und daher ist es unwahrscheinlich, dass Veränderungen im subzellulären Milieu für die Inaktivierung von Cdc25 verantwortlich sind (Peng et al., 1997, Science, 277: 1501–1505).

#### Beispiel 5 Direkte Wirkung von hCDS1 auf Cdc25

**[0071]** Indirekte Inhibitionsmechanismen von Cdc25 durch hCDS1 konnten durch die Zelllysate-Assays nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden Affinitäts-gereinigte Reagenzien verwendet, um eine direkte Phosphorylierung und Inhibition der GST-Cdc25-Aktivität durch hCDS1 zu bestimmen.

**[0072]** GST-Cdc25 wurde entweder mit 6his-hCDS1, Mock-Beads oder 6his-Chk1 in der Gegenwart von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. GST-Cdc25 wurde durch 6 his-Chk1 und durch 6his-hCDS1 phosphoryliert. Die Assays wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Cdc25-Phosphatase-Aktivität durch diese Phosphorylierung betroffen war.

**[0073]** GST-Cdc25 wurde auf dessen Fähigkeit untersucht, die Histon-H1-Kinase-Aktivität von Cdc2/Cyclin B-Immünpräzipitaten zu aktivieren. Es wurde festgestellt, dass eine Phosphorylierung von GST-Cdc25 durch 6his-hCDS1 die Fähigkeit von GST-Cdc25 hemmte, Cdc2/Cyclin B zu aktivieren. Daher zeigen diese Daten, dass 6his-hCDS1 Cdc25 in vitro inaktivierte und dass Cdc25 nach einem DNA-Schaden in vivo inaktiviert ist.

**[0074]** Da 6his-Chk1 mit GST-Cdc25 assoziiert ist und eine Histon-h1-Kinase-Aktivität in vitro besitzt (Sanchez et al., 1997, Science, 277: 1497–501), wurde eine Analyse von Cdc2/Cyclin B-Kinase-Aktivität durchgeführt. Um die GST-Chk1-Wirkungen zu testen, wurde ein Assay verwendet, indem eine Cdc2-Dephosphorylierung durch das Verschwinden der langsamer migrierenden Spezies von Cdc2 mit Gelmobilitätsanalysen kontrolliert wurde.

**[0075]** Kurz gesagt wurde phosphoryliertes Cdc2 aus Sf9-Zellen gereinigt, die gleichzeitig mit rekombinanten Baculoviren, die für 6his-Cdc2, 6his-Weel, 6his-Myt1 und GST-Cyclin B kodieren, infiziert (Parker et al., 1992, Science, 257: 1955–1957). Das 6his-Cdc2, das mit Cyclin B im Komplex war, wurde unter Verwendung von GSH-Beads unter denselben Bedingungen wie für GST-Cdc25 gereinigt, außer dass 1 mM  $VO_4$  in dem Lysepuffer vorhanden war. Eine Western-Blot-Analyse zeigte, dass eine vierfache Infektion eine Phosphorylierung des Hauptteils von Cdc2/GST-Cyclin B an einer oder beiden inhibitorischen Stellen bewirkte. Diese Phosphatase-Assays wurden in der Gegenwart von 10 mM EDTA und der Abwesenheit von ATP durchgeführt, unter Bedingungen, die die Möglichkeit von 6his-Chk1 ausschließen, Cdc2 oder Cyclin B direkt zu phosphorylieren. GST-Cdc25 katalysiert eine Verringerung der langsamer migrierenden phosphorylierten Formen von Cdc2. Vor einer Phosphorylierung von GST-Cdc25 durch 6his-Chk1 folgt eine dosisabhängige Verringerung bei der GST-Cdc25-Aktivität. Diese Daten bestätigen, dass Chk1 die Cdc25-Aktivität negativ reguliert (Furnari et al., 1997, Science, 277: 1495–1497; Weinert, 1997, Science, 277: 1450) und verdeutlichen darüber hinaus, dass die negative Regulation eine Inaktivierung der Phosphatase-Aktivität beinhaltet.

#### Beispiel 6 DNA-Schaden und Modifikation von hCDS1

**[0076]** Da die vorhergehenden Daten gezeigt haben, dass 6his-hCDS1 Cdc25 inaktiviert und dass ein

DNA-Schaden mit einer Cdc25-Inaktivierung assoziiert ist, wurde ein Assay durchgeführt, um zu bestimmen, ob ein DNA-Schaden zu einer Modifikation oder Aktivierung von hCDS1 führt. Es wurden Antiseren, die gegen 6his-hCDS1 gewonnen wurden, in Immunkomplex-Kinase-Assays unter Verwendung von HeLa-Zelllysaten verwendet. Es wurde ein schwaches Signal, das hCDS1 entspricht, in der Probe von asynchronen HeLa-Zellen nachgewiesen; eine erhöhte Phosphorylierung von hCDS1 wurde nach einer Bestrahlung beobachtet.

**[0077]** Kurz gesagt wurden Antikörper gegen hCDS1 durch Immunisierung eines Kaninchens mit 6his-hCDS1, das aus Sf9-Zellen gereinigt wurde, hergestellt (Harlow et al., *Antibodies* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1988)). Das resultierende Antiserum immunpräzipitiert eine aktive Kinase mit dem erwarteten Molekulargewicht aus Sf9-Zellen, die mit 6his-Chk1-Virus infiziert waren, nicht jedoch aus nichtinfizierten Sf9-Zellen oder von anderen Zellen, die mit 6his-Chk1-Virus infiziert waren.

**[0078]** Es wurde festgestellt, dass die Ergebnisse auf hCDS1 zurückzuführen waren, indem die Proteinbande nach einer Denaturierung in 4% SDS re-präzipitiert wurde. Die *in vitro*-Phosphorylierung ist sehr wahrscheinlich auf eine Autophosphorylierung zurückzuführen und das erhöhte Signal entspricht einem Anstieg der Aktivität nach der Bestrahlung. Die Zunahme der *in vitro*-Phosphorylierung von p64<sup>Cds1</sup> legt nahe, dass hCDS1, wie RAD53 und DUN1, als Antwort auf DNA-Schaden modifiziert ist.

**[0079]** Die Wirkung einer Arretierung der DNA-Synthese auf die Phosphorylierung von p64<sup>Cds1</sup> wurde durch einen weiteren Assay untersucht. Das hCDS1 aus Replikations-arretierten Zellen verhielt sich genauso wie das Protein aus asynchronen Kulturen; es wurde kein signifikanter Anstieg bei der Phosphorylierung als Antwort auf Thymidin oder anderen Agenzien, die die DNA-Replikation blockieren, beobachtet. Die erhöhte Phosphorylierung von p64<sup>Cds1</sup> wurde nach einer Bestrahlung von Thymidin-arretierten Zellen nachgewiesen. Es wurde auch Wirkung einer Beschädigung von DNA in Zellen, die hauptsächlich außerhalb der S-Phase arretiert wurden, getestet. Die Zellen wurden in der Gegenwart von Nocodazol für 20 Stunden vor der Bestrahlung inkubiert. Es wurde wiederum ein schwaches aber nachweisbares Signal in der nicht-bestrahlten Probe beobachtet. Jedoch führte eine Bestrahlung von Nocodazol-arretierten Zellen zu einer erhöhten Phosphorylierung.

**[0080]** Diese Resultate sind überraschenderweise gegensätzlich zu den Ergebnissen, wie sie in der Hefe gefunden wurden, in der festgestellt wurde, dass CDS1 der Spaltheife als Antwort auf unvollständig replizierte DNA aktiviert ist (Boddy et al., 1998, *Science*, 280: 909–12; Lindsay et al., 1998, *Genes and Dev.*, 12: 382–95). Die Ergebnisse hier zeigen eine Rolle von humanem Cds1 beim DNA-Schadens-Checkpoint und nicht im ReplikationsCheckpoint, wie zuvor in der Hefe festgestellt.

#### Beispiel 7 Arzneimittelidentifikation

**[0081]** Die oben beschriebenen Cdc25-Assays sind geeignet zur Verwendung bei der Identifikation von chemischen Agenzien, welche den DNA-Schadens-Checkpoint, der durch hCSD1 und Cdc25 vermittelt ist, entweder durch eine erhöhte oder inhibierte Aktivität modifizieren. Daher würde ein typischer Screening-Assay ähnliche Bedingungen verwenden, wie oben beschrieben, plus dem Zusatz eines zu testenden Reagens. Die Kontrolle der Aktivität der Assay-Bestandteile, d.h. der Nachweis der Phosphorylierung, wie oben beschrieben, kann im Vergleich mit Kontrollreaktionen durchgeführt werden, um sowohl eine erhöhte als auch inhibierte Aktivität nachzuweisen.

**[0082]** Es ist klar, dass solche Assays leicht an eine mechanische, automatisierte Vorrichtung und -Nachweis angepasst werden können. Mit den grundlegenden Elementen der bekannten Assay-Reaktionen ist der Assay klar geeignet zur Verwendung zusammen mit automatisierten Niedrigsignalvorrichtungen mit hohem Durchsatz, die mikroskopische Objektträger-Arrays oder Zell-Biochip-Arrays zusammen mit CCD-Nachweisvorrichtungen enthalten können und zur Verwendung eines sichtbaren Signals, das durch Phosphorylierung oder eine andere Reaktion ausgelöst wird, zur Kinase-Aktivität.

#### Beispiel 8 Therapeutische Verwendung

**[0083]** Die Charakterisierung von hCDS1 und die Feststellung, dass das humane Cds1 eine Rolle hat beim DNA-Schadens-Checkpoint und nicht bei dem Replikations-Checkpoint wie in der Hefe, ermöglicht die Anwendung dieses Wissens für die Herstellung von Pharmazeutika und therapeutischen Verfahren, um als Zusatz für eine Chemotherapie gegen Krebs zu wirken.

**[0084]** Insbesondere umfassen erfindungsgemäße pharmazeutische Formulierungen cDNA, RNA, Antisense-moleküle, hCDS1-Protein, Antikörper gegen hCDS1-Protein oder andere Therapeutika, die denen entspre-

chen, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Assays identifiziert werden und können zusammen mit einem geeigneten chemotherapeutischen Reagenz verabreicht werden, um als ein Zusatz für die Hauptwirkung des chemotherapeutischen Agens zu wirken. Zum Beispiel ist die Verwendung von Antikrebsarzneimitteln, wie Antimetaboliten, Antibiotika, alkylierenden Agenzien, Mikrotubulus-Inhibitoren, Steroidhormonen und deren Antagonisten und andere, allgemein gegen metabolische Punkte gerichtet, die für die Zellreplikationen essentiell sind. Während idealerweise diese Arzneimittel nur mit den zellulären Prozessen interferieren sollen, die für maligne Zellen charakteristisch sind, beeinflussen gegenwärtig verfügbare Antikrebsarzneimittel alle proliferierenden Zellen, d.h. sowohl normale als auch maligne Zellen. Daher ist eine gegenwärtige Chemotherapie durch eine scharfe Dosis-Antwort-Kurve der beiden toxischen und therapeutischen Wirkungen behindert. Daher ermöglicht eine Co-Verabreichung der erfindungsgemäßen hCDS1-basierenden Arzneimittel und Arzneimittel, die durch die erfindungsgemäßen hCDS1-Assays identifiziert werden, mit chemotherapeutischen Agenzien ein verstärktes Abtöten von malignen Zellen.

**[0085]** Ein Mechanismus zum verstärkten Abtöten wird erreicht, indem die DNA-Schadens-Checkpointkontrolle von malignen Zellen ausgeschaltet wird, um so die Verabreichung von DNA-schädigenden chemotherapeutischen Agenzien wirksamer zu machen. Das Ausschalten des DNA-Schadens-Checkpoints kann bewirkt werden, indem die hCDS1-Antwort, wie durch die Daten oben gezeigt, modifiziert wird.

**[0086]** Daher ist die Co-Verabreichung von neuen hCDS1-basierenden Therapeutika in Kombination mit einem oder mehreren beliebigen Antikrebsmitteln von der vorliegenden Erfindung umfasst. Zum Beispiel können normale Dosierungen der Antikrebsarzneimittel Cytarabin, Fludarabin, 5-Fluoruracil, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, 6-Thioguanin, Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Plicamycin, Carmustin, lomustin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Mechlorethamin, Streptozotocin, Navelbin<sup>®</sup>, Paclitaxel, Vinblastin, Vincristin, Asparaginase, Cisplatin, Carboplatin, Etoposid, Interferone, Procarbazine etc. mit der geeigneten Menge von hCDS1-basierendem Arzneimittel verabreicht werden, so dass a) die Länge der Zeit zur Verabreichung verändert wird, b) die Zeit zwischen den Verabreichungen verändert wird, c) die Wirksamkeit des chemotherapeutischen Agens auf maligne Zellen verändert wird oder d) die Nebenwirkungen des chemotherapeutischen Agens auf normale Zellen verändert wird. Die Wirkungen der Co-Verabreichung von hCDS1-basierenden Arzneimitteln kann eine oder eine Kombination dieser Wirkungen neben anderen sein.

**[0087]** Typischerweise folgt eine Zerstörung von Krebszellen durch chemotherapeutische Agenzien Kinetiken erster Ordnung für eine lange Abtötungswirkung. Daher würde die Co-Verabreichung von hCDS1-basierenden Therapeutika so geplant werden, dass sie die lange Abtötungswirkung erhöhen. Typischerweise erfordern chemotherapeutische Behandlungsprotokolle eine Kombination von Arzneimitteln, die in unterschiedlichen Stadien des Stoffwechselwegs wirken und dadurch das Abtöten erhöhen, während die toxischen Spiegel niedrig bleiben. Daher würden die Co-Verabreichung von hCSD1-basierenden Therapeutika idealerweise eine Kombination von solchen Protokollen sein, um deren Wirksamkeit zu verbessern.

**[0088]** Idealerweise würden die am meisten wirksamen therapeutischen Verfahren eine zielgerichtete Verabreichung von chemotherapeutischen Arzneimitteln und/oder MDR(multidrug resistance)-inhibierenden Agenzien mit hCDS1-basierenden Therapeutika kombinieren, um spezifisch maligne Zellen über die zelleigene nicht-kontrollierte Replikation ohne DNA-Schadensreparatur zu treffen und zu eliminieren und sie so schließlich zum Zelltod zu führen.

**[0089]** Die vorhergehende Diskussion und Beispiele sollen die vorliegende Erfindung veranschaulichen und diese nicht beschränken. Es sind noch andere Varianten möglich, die in den Grundgedanken und Umfang der Erfindung fallen und der Fachmann wird diese leicht erkennen.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Janssen Pharmaceutica  
 <120> Humane Checkpoint-Kinase, hCDS1, Zusammensetzungen und Verfahren  
 <130> TSRI649.SPA  
 <140>  
 <141>  
 <150> GB 9722320.0  
 <151> 1997-10-22  
 <160> 6  
 <170> PatentIn Ver. 2.0  
 <210> 1  
 <211> 1858  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (66)..(1694)  
 <400> 1

```

actagtgtgatt actcacaggg ctcgagcggc cgcccgggca ggtcaggtgg gctcacgagg 60
tcgtg atg tct cgg gag tcg gat gtt gag gct cag cag tct cat ggc agc 110
Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser
      1          5          10          15
agt gcc tgt tca cag ccc cat ggc agc gtt acc cag tcc caa ggc tcc 158
Ser Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser
      20          25          30
tcc tca cag tcc cag ggc ata tcc agc tct tct acc agc acg atg cca 206
Ser Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro
      35          40          45
aac tcc agc cag tcc tct cac tcc agc tct ggg aca ctg agc tcc tta 254
Asn Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu
      50          55          60
gag aca gtg tcc act cag gaa ctc tat tct att cct gag gac caa gaa 302
Glu Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu
      65          70          75
cct gag gac caa gaa cct gag gag cct acc cct gcc ccc tgg gct cga 350
Pro Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg
      80          85          90
tta tgg gcc ctt cag gat gga ttt gcc aat ctt gaa tgt gtg aat gac 398
Leu Trp Ala Leu Gln Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp
      100          105          110
aac tac tgg ttt ggg agg gac aaa agc tgt gaa tat tgc ttt gat gaa 446
Asn Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu
      115          120          125
cca ctg ctg aaa aga aca gat aaa tac cga aca tac agc aag aaa cac 49
Pro Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His
      130          135          140
ttt cgg att ttc agg gaa gtg ggt cct aaa aac tct tac att gca tac 542
Phe Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr
      145          150          155
ata gaa gat cac agt ggc aat gga acc ttt gta aat aca gag ctt gta 590
Ile Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val
      160          165          170
ggg aaa gga aaa cgc cgt cct ttg aat aac aat tct gaa att gca ctg 638
Gly Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu
      180          185          190
cca cta agc aga aat aaa gtt ttt gtc ttt ttt gat ctg act gta gat 686
Ser Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp
      195          200          205
gat cag tca gtt tat cct aag gca tta aga gat gaa tac atc atg tca 734
Asp Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser
      210          215          220
aaa act ctt gga agt ggt gcc tgt gga gag gta aag ctg gct ttc gag 782
Lys Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu
      225          230          235
ggg aaa aca tgt aag aaa gta gcc ata aag atc atc agc aaa agg aag 830
Arg Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys
  
```

```

240          245          250          255
ttt gct att ggt tca gca aga gag gca gac cca gct ctc aat gtt gaa 878
Phe Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu
260          265
aca gaa ata gaa att ttg aaa aag cta aat cat cct tgc atc atc aag 926
Thr Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys
275          280          285
att aaa aac ttt ttt gat gca gaa gat tat tat att gtt ttg gaa ttg 974
Ile Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu
290          295          300
atg gaa ggg gga gag ctg ttt gac aaa gtg gtg ggg aat aaa cgc ctg 1022
Met Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu
305          310          315
aaa gaa gct acc tgc aag ctc tat ttt tac cag atg ctc ttg gct gtg 1070
Lys Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val
320          325          330
cag tac ctt cat gaa aac ggt att ata cac cgt gac tta aag cca gag 1118
Gln Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu
340          345          350
aat gtt tta ctg tca tct caa gaa gag gac tgt ctt ata aag att act 1166
Asn Val Leu Leu Ser Ser Gln Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr
355          360          365
gat ttt ggg cac tcc aag att ttg gga gag acc tct ctc atg aga acc 1214
Asp Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr
370          375          380
tta tgt gga acc ccc acc tac ttg gcg cct gaa gtt ctt gtt tct gtt 1262
Leu Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val
385          390          395
ggg act gct ggg tat aac cgt gct gtg gac tgc tgg agt tta gga gtt 1310
Gly Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val
400          405          410
att ctt ttt atc tgc ctt agt ggg tat cca cct ttc tct gag cat agg 1358
Ile Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu His Arg
420          425          430
act caa gtg tca ctg aag gat cag atc acc agt gga aaa tac aac ttc 1406
Thr Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe
435          440          445
att cct gaa gtc tgg gca gaa gtc tca gag aaa gct ctg gac ctt gtc 1454
Ile Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val
450          455          460
aag aag ttg ttg gta gtg gat cca aag gca cgt ttt acg aca gaa gaa 1502
Lys Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu
465          470          475
gcc tta aga cac ccg tgg ctt cag gat gaa gac atg aag aga aag ttt 1550
Ala Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe
480          485          490
caa gat ctt ctg tct gag gaa aat gaa tcc aca gct cta ccc cag gtt 1598
Gln Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val
500          505          510
cta gcc cag cct tct act agt cga aag cgg ccc cgt gaa ggg gaa gcc 1646
Leu Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala
515          520          525
gag ggt gcc gag acc aca aag cgc cca gct gtg tgt gct gct gtg ttg 1694
Glu Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
530          535          540
tgaactccgt ggtttgaaca cgaaagaaat gtaccttctt tcaactctgtc atctttcttt 1754
tctttgagtc tgttttttaa tagtttggat tttaattatg ggaataattg ctttttcaca 1814
gtcactgatg tacaattaa aacctgatgg aacctggaaa aaaa 1858
<210> 2
<211> 543
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
1 5 10 15
Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
20 25 30
Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn
35 40 45

```

Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu  
 50 55 60  
 Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu  
 85 90 95  
 Trp Ala Leu Gln Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp Asn  
 100 105 110  
 Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His Phe  
 130 135 140  
 Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr Ile  
 145 150 155 160  
 Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val Gly  
 165 170 175  
 Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu Ser  
 180 185 190  
 Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp Asp  
 195 200 205  
 Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser Lys  
 210 215 220  
 Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu Arg  
 225 230 235 240  
 Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe  
 245 250 255  
 Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr  
 260 265 270  
 Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile  
 275 280 285  
 Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met  
 290 295 300  
 Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln  
 325 330 335  
 Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn  
 340 345 350  
 Val Leu Leu Ser Ser Gln Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr Asp  
 355 360 365  
 Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr Leu  
 370 375 380  
 Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val Gly  
 385 390 395 400  
 Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val Ile  
 405 410 415  
 Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Ser Glu His Arg Thr  
 420 425 430  
 Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe Ile  
 435 440 445  
 Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val Lys  
 450 455 460  
 Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu Ala  
 465 470 475 480  
 Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe Gln  
 485 490 495  
 Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val Leu  
 500 505 510  
 Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala Glu  
 515 520 525  
 Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu  
 530 535 540

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der artifiziiellen Sequenz: PCR-Primer GSP3

<400> 3

```

ttttgctgat gatctttatg gctac                25
<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artifizelle Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der artifizellen Sequenz: PCR-Primer
      GSP4
<400> 4
cacaggcacc acttccaaga gtttt                25
<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artifizelle Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der artifizellen Sequenz: PCR-Primer
<400> 5
gggctcgaga gcagcgatgt ctcgggagtc ggatgt    36
<210> 6
<211> 35
<212> DNA
<213> Artifizelle Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der artifizellen Sequenz: PCR-Primer
<400> 6
ggcggatcct cgagtcacaa cacagcagca cacac    35

```

### Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäure, die für HCDS1 kodiert mit der Nukleinsäuresequenz wie sie in der in [Fig. 1](#) gezeigten Nukleinsäuresequenz von der Position 66 bis 1694 wiedergegeben ist (SEQ ID NO: 1).
2. Isolierte Nukleinsäure, die für ein Protein mit der in [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2), oder ein funktionelles Äquivalent oder Biovorläufer von einem solchen Protein kodiert, worin das funktionelle Äquivalent durch eine Substitution in der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 gekennzeichnet ist, worin die Substitution nicht die Aktivität von diesem Protein beeinflusst, worin das Protein auf den humanen Zellzyklus-Kontrollpunkt-Weg einwirkt.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 2, wobei es sich um ein DNA-Molekül handelt.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, worin das DNA-Molekül eine cDNA ist.
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 3 oder 4 mit der Nukleinsäuresequenz wie sie in der in [Fig. 1](#) gezeigten Nukleinsäuresequenz von der Position 66 bis 1694 wiedergegeben ist (SEQ ID NO: 1), oder dem Komplement davon oder einer Sequenz die an diese oder an das Komplement unter hoch stringenten Bedingungen hybridisieren kann.
6. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 2 bis 5, worin die Nukleinsäure eine Modifikation enthält ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Internukleotidverknüpfungs-Modifikation, einer Nukleotidbasen-Modifikation, einer Nukleotid-Zucker-Modifikation, einer nichtradioaktiven Markierung, einer Nukleinsäure-Kreuzvernetzung und einer Peptid-Nukleinsäure-Modifikation.
7. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung zur Behandlung von Krebs oder einer anderen proliferativen Krankheit.
8. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung als ein Arzneimittel.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, Verdünnungsmittel oder einem Arzneistoffträger dafür.
10. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs oder einer proliferativen Krankheit.
11. Verwendung nach Anspruch 10, worin die pharmazeutische Zusammensetzung weiter einen pharma-

zeitlich annehmbaren Träger, Verdünnungsmittel oder ein Arzneistoffträger dafür umfasst.

12. Verfahren zum Nachweis des Vorliegens oder Fehlens einer Nukleinsäure nach Anspruch 1 in einer biologischen Probe, worin das Verfahren das In-Kontakt bringen der Probe mit einer Sonde, die eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umfasst, unter hybridisierenden Bedingungen, und den Nachweis des Vorliegens einer Duplex- oder Triplexbildung zwischen der Sonde und einer beliebigen in der Probe vorliegenden Nukleinsäure, umfasst.

13. Isoliertes Plasmid, worin das Plasmid unter der Hinterlegungsnummer LMBP 3708 hinterlegt worden ist.

14. Isoliertes Plasmid, worin das Plasmid unter der Hinterlegungsnummer LMBP 3710 hinterlegt worden ist.

15. Isoliertes Plasmid, worin das Plasmid unter der Hinterlegungsnummer LMBP 3709 hinterlegt worden ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

## HCDS1-cDNA-Nukleotidsequenz

```

1   actagtgatt actcacaggg ctcgagcggc cgcccgggca ggtcaggtgg 50
51  gctcacgegg tcgtgatgtc tcgggagtcg gatgttgagg ctcagcagtc 100
101 tcatggcagc agtgccctgtt cacagcccca tggcagcgtt acccagtccc 150
151 aaggctcctc ctcacagtcc cagggcatat ccagctcctc taccagcacg 200
201 atgccaaact ccagccagtc ctctcactcc agctctggga cactgagctc 250
251 cttagagaca gtgtccactc aggaactcta ttctattcct gaggaccaag 300
301 aacctgagga ccaagaacct gaggagccta cccctgcccc ctgggctcga 350
351 ttatgggccc ttcaggatgg atttgccaat cttgaatgtg tgaatgacaa 400
401 ctactggttt gggagggaca aaagctgtga atattgcttt gatgaaccac 450
451 tgctgaaaag aacagataaa taccgaacat acagcaagaa acactttcgg 500
501 attttcaggg aagtgggtcc taaaaactct tacattgcat acatagaaga 550
551 tcacagtggc aatggaacct ttgtaaatac agagcttgta gggaaaggaa 600
601 aacgccgtcc tttgaataac aattctgaaa ttgcactgtc actaagcaga 650
651 aataaagttt ttgtcttttt tgatctgact gtagatgac agtcagttta 700
701 tcctaaggca ttaagagatg aatacatcat gtcaaaaact cttggaagtg 750
751 gtgcctgtgg agaggtaaag ctggctttcg agaggaaaac atgtaagaaa 800
801 gtagccataa agatcatcag caaaaggaag tttgctattg gttcagcaag 850
851 agaggcagac ccagctctca atgttgaaac agaaatagaa attttgaaaa 900
901 agctaaatca tccttgcatc atcaagatta aaaacttttt tgatgcagaa 950
951 gattattata ttgttttggg attgatggaa gggggagagc tgtttgacaa 1000
1001 agtgggtggg aataaacgcc tgaaagaagc tacctgcaag ctctattttt 1050
1051 accagatgct cttggctgtg cagtaccttc atgaaaacgg tattatacac 1100
1101 cgtgacttaa agccagagaa tgttttactg tcatctcaag aagaggactg 1150
1151 tcttataaag attactgatt ttgggcactc caagattttg ggagagacct 1200
1201 ctctcatgag aaccttatgt ggaaccccca cctacttggc gcctgaagtt 1250
1251 cttgtttctg ttgggactgc tgggtataac cgtgctgtgg actgctggag 1300
1301 tttaggagtt attcttttta tctgccttag tgggtatcca cctttctctg 1350
1351 agcataggac tcaagtgtca ctgaaggatc agatcaccag tggaaaatac 1400
1401 aacttcattc ctgaagtctg ggcagaagtc tcagagaaag ctctggacct 1450
1451 tgtcaagaag ttgttggtag tggatccaaa ggcacgtttt acgacagaag 1500
1501 aagccttaag acaccctggg cttcaggatg aagacatgaa gagaaagttt 1550
1551 caagatcttc tgtctgagga aatgaatcc acagctctac cccaggttct 1600
1601 agcccagcct tctactagtc gaaagcggcc cctggaaggg gaagccgagg 1650
1651 gtgccgagac cacaaagcgc ccagctgtgt gtgctgctgt gttgtgaact 1700
1701 ccgtggtttg aacacgaaag aatgtacct tctttcactc tgatctcttt 1750
1751 cttttctttg agtctgtttt tttatagttt gtattttaat tatgggaata 1800
1801 attgcttttt cacagtcact gatgtacaat taaaaacctg atggaacctg 1850
1851 gaaaaaaaa

```

**FIG. 2**

Vorhergesagte hCDS1-Aminosäuresequenz

1 MSRESDVEAQ QSHGSSACSQ PHGSVTQSQG SSSQSQGISS 40  
41 SSTSTMPNSS QSSHSSSGTL SSLETVSTQE LYSIPEDQEP 80  
81 EDQEPEEPTP APWARLWALQ DGFANLECVN DNYWFGRDKS 120  
121 CEYCFDEPLL KRTDKYRTYS KKHFRIFREV GPKNSYIAYI 160  
161 EDHSGNGTFV NTELVGKGKR RPLNNNSEIA LSLSRNKVFFV 200  
201 FFDLTVDDQS VYPKALRDEY IMSKTLGSGA CGEVKLAFER 240  
241 KTCKKVAIKI ISKRKFAIGS AREADPALNV ETEIEILKKL 280  
281 NHPCIIKIKN FFDAEDYYIV LELMEGGELF DKVVGNKRLK 320  
321 EATCKLYFYQ MLLAVQYLHE NGIIHRDLKP ENVLLSSQEE 360  
361 DCLIKITDFG HSKILGETSL MRTLCGTPTY LAPEVLVSVG 400  
401 TAGYNRAVDC WSLGVILFIC LSGYPPFSEH RTQVSLKDQI 440  
441 TSGKYNFIPE VWAEVSEKAL DLVKKLLVVD PKARFTTEEA 480  
481 LRHPWLQDED MKRKFQDLLS EENESTALPQ VLAQPSTSRK 520  
521 RPREGEAEGA ETTKRPAVCA AVL

HCDS1 : MPNSSQSSHSISGGILSSLETVSTQELYSIPEDQEPEDQEPPEEPTAPAPWARLWALQDGFANLECVNDNYW-FGRDKSCEY : 78  
 S.p.CDS1 : ME---EPEEAIQAEAPLHVSONIAKQVNN-----ENVFMKLVMTRMLDGKTEVIPLETTDVHNGFVGFGRHKSEV : 70

HCDS1 : CFDEPLLARTDKYRTYSKKHFRIFREVGPKNSYIAYIEDHSGAGTFVNTLAVGKGRRPANNNSIALSISRNK----- : 152  
 S.p.CDS1 : VLAGE--RVSNFHFIEIYQGRNDSDES--EN--VVELHDHSSNGTELNFERLAKNSRTIISNGDEIRIGLVGVPDEISF : 143

HCDS1 : -VVFVFDLTVDDQSVVYPRALRDEYIMSNTIGSGACGEVKLAIFERKTCRKKVATKIISKRRFAIGSARBADPALNVFTEJE : 230  
 S.p.CDS1 : LCQMPVKHSRSGSKNMIKSENSHVEIIRTLGSGTFAVVKLAVEVNSGMYATKIINKRNILLETASS-EKRATEMFORQID : 221

HCDS1 : ILKLNHPCLIKIKVFFDAET-YVIVIELMEGGEIFDKVWGNRIKKEATCALYFYQMLLAQYEHENGIHHRDLKPENV : 308  
 S.p.CDS1 : ILSLHPGVAQCHEICENDDELIVMEYVEGCDLMEFLIANGSIDQDCKPLLKQLLETLLHLHKQGVTHRDIKPENI : 300

HCDS1 : LLSQEDCLIKITDFGHSKILGET-SLMRIICGTPYVLAPEVIVSVGT---AGYMRVDCISLGVILFICLSGYPPFS : 383  
 S.p.CDS1 : LITN---DFHLKISDFGLAKVIGHGIGTFEIFCGIMGYLAPEVLKSKNVNLDGGYDKVDIISLGCVLVYMLTASIPFA : 376

HCDS1 : EHRFQVSLKDOIISGKYNFIPEVMAEVSEKALDLVKKLLVDFKARFTTEEARHPQLQEDMKRKFQDLLSEENESTA : 462  
 S.p.CDS1 : SS-SQAKCIELISKCAVPIEPIENEISEEGIDLINRMPIINPEKRRISEALCPHFYT----- : 435

HCDS1 : LPQVLAQPSTSRKRPREGEAEAGAEITTKRPAVCAAVL : 498  
 S.p.CDS1 : -----VSTHEHTPSSSHEATEQLNSSS----- : 460

FIG. 3