



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 740 T2** 2006.09.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 868 519 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 740.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/18859**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 940 870.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/022702**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.11.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.06.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.10.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.09.2006**

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

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

8809 P **18.12.1995** **US**

23943 P **14.08.1996** **US**

(73) Patentinhaber:

Sugen, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**PLOWMAN, D., Gregory, San Carlos, CA 94070,
US; MOSSIE, G., Kevin, Lakefield 1501 Gauteng,
ZA**

(54) Bezeichnung: **DIAGNOSE UND BEHANDLUNG VON MIT AUR-1 UND/ODER AUR-2 ASSOZIIERTEN ERKRANKUNGEN**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die neuen AURORA EINS und AURORA ZWEI genannten Proteine („AUR-1 und AUR-2“), Nukleotidsequenzen, die AUR-1 und/oder AUR-2 kodieren, sowie verschiedene Produkte und Verfahren, die für die Diagnose und Behandlung von verschiedenen mit AUR-1 und/oder AUR-2 in Beziehung stehenden Krankheiten und Zuständen nützlich sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die folgende Beschreibung des Hintergrunds der Erfindung wird bereitgestellt, um beim Verständnis der Erfindung zu helfen, aber es wird nicht anerkannt, dass diese für die Erfindung Stand der Technik ist.

[0003] Die zelluläre Signalweiterleitung ist ein grundlegender Mechanismus durch den äußere Stimuli, die verschiedene zelluläre Prozesse regulieren, in das Innere von Zellen weitergeleitet werden. Einer der biochemischen Schlüsselmechanismen der Signaltransduktion schließt die reversible Phosphorylierung von Proteinen ein, was die Regulation der Aktivität von reifen Proteinen durch das Verändern ihrer Struktur und Funktion ermöglicht.

[0004] Die am besten untersuchten Proteinkinasen in Eukaryoten phosphorylieren Proteine an der Alkoholgruppe von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Diese Kinasen fallen größtenteils in zwei Gruppen, die, die für die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen spezifisch sind und die, die für die Phosphorylierung von Tyrosinen spezifisch sind. Einige Kinasen, die als „dual specificity“ Kinasen bekannt sind, sind in der Lage sowohl Tyrosin als auch Serin/Threoninreste zu phosphorylieren.

[0005] Proteinkinasen können ebenfalls über ihre Lokalisation innerhalb der Zelle charakterisiert werden. Einige Kinasen sind Transmembranproteine vom Rezeptortyp, die in der Lage sind als Antwort auf die äußere Umgebung, wie zum Beispiel die Bindung eines Liganden, ihre katalytische Aktivität direkt zu verändern. Andere sind nicht-rezeptor-artige Proteine, denen eine Transmembrandomäne fehlt. Sie können in einer Reihe von zellulären Kompartimenten von der inneren Oberfläche der Zellmembran bis zum Zellkern gefunden werden.

[0006] Viele Kinasen sind an regulatorischen Kaskaden beteiligt, wobei ihre Substrate andere Kinasen, deren Aktivität über ihren Phosphorylierungszustand reguliert wird, einschließen können. Letztlich wird die Aktivität eines Downstream-Effektors durch die Phosphorylierung, die aus der Aktivierung eines solchen Signalweges resultiert, moduliert.

[0007] Die Familie der Serin-/Threonin-Kinasen schließt Mitglieder ein, die in allen Stufen von verschiedenen Signalkaskaden gefunden werden, einschließlich solche, die an der Kontrolle von Zellwachstum, Migration, Differenzierung und Sekretion von Hormonen, Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, was in veränderter Genexpression resultiert, Muskelkontraktion, Glukosestoffwechsel, Kontrolle der zellulären Proteinsynthese und Regulation des Zellzyklus beteiligt sind.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptide, Nukleinsäuren, die solche Polypeptide kodieren, Zellen, die solche Nukleinsäuren enthalten, Antikörper gegen solche Polypeptide, Assays, die solche Polypeptide verwenden und Verfahren die sich auf alle der vorangehenden beziehen. Die vorliegende Erfindung basiert auf der Isolierung und Charakterisierung neuer Proteine, die wir als AUR-1 und/oder AUR-2 bezeichnet haben. Die Polypeptide und Nukleinsäuren können unter Verwendung gut bekannter Standardsynthesetechniken hergestellt werden, wenn die hierin präsentierten Sequenzen vorliegen. AUR-1 und AUR-2 sind verwandte Serin/Threonin-Kinasen mit kurzen N-terminalen Verlängerungen. Es scheint dass die Homologe aus Drosophila und Hefe an der mitotischen Regulation beteiligt sind. Die menschlichen Proteine scheinen an Krebs und/oder anderen Signalübertragungsstörungen beteiligt zu sein. AUR-1 RNA wird allgemein in sich schnell teilenden Zellen, abgeleitet sowohl von normalen als auch Tumorgeweben, exprimiert. AUR-2 RNA wird jedoch in einem stärker begrenzten Muster exprimiert, und wird in den meisten normalen Geweben wenig oder nicht exprimiert und ist nur in einer Untergruppe von, von Tumoren abgeleiteten Zelllinien, insbesondere solchen kolorektalen Ursprungs, reichlich vorhanden. Sowohl AUR1 als auch AUR2 zeigen eine mittlere Expression in fötaler Leber, erwachsenem Hoden und Thymus, was für eine norma-

le Rolle dieser Proteine in der meiotischen Teilung spricht. Sowohl AUR-1 als auch AUR-2 scheinen die Kernteilung zu regulieren, wobei die Unterbrechung ihres Signalweges zu polyploiden Zellen führt. Dieser Phänotyp ist wahrscheinlich auf fehlerhafte chromosomale Trennung zurückzuführen, wie bei ihrem Hefehomolog IPL1 zu beobachten ist. Da Polyploidität ein Kennzeichen von Tumorzellen und Zellen, die einen Defekt in dem Tumorsuppressor p53 aufweisen, ist, testen wir die Rolle von AUR-1 und AUR-2 in der zellulären Transformation.

[0009] Eine Primärsequenzanalyse der menschlichen Gene zeigte, dass sie eine hoch konservierte C-terminale Proteinkinasedomäne und eine schwach konservierte N-terminale Domäne mit 74 bis 130 Aminosäuren, die eine regulatorische Rolle spielen kann oder als ein Substratbindungsmotiv wirkt, enthalten. Die menschlichen Gene enthalten ebenfalls eine cAMP/PKA Phosphorylierungsstelle R/KR/KXS/T in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne, was einen regulatorischen Signalweg vergleichbar mit dem von Zellzyklus regulierten CDC2/CDK-verwandten Proteinen vermuten lässt.

[0010] Southern-Analyse mit von den einzigartigen N-terminalen Regionen von AUR1 und AUR2 abgeleiteten Sonden zeigte, dass sie in menschlichen Zellen als Einzelkopie-Gene vorliegen. Unter niedrigen Stringenzbedingungen waren wir jedoch in der Lage, 1,3 kb und 3,2 kb SacI Fragmente zu entdecken, die schwach an die AUR-1 Sonde hybridisieren. Die Klonierung und Sequenzanalyse zeigte, dass diese Region ein Intron-lostes AUR1-verwandtes Pseudogen (genannt AUR3) mit mehreren Leserahmenverschiebungen kodiert. Des Weiteren liegt direkt stromaufwärts des AUR3 Pseudogens eine Region mit komplexen invertierten Wiederholungen, für die vorhergesagt wird, dass sie eine sehr stabile Haarnadelschleife bildet. Die AUR3 DNA-Sequenz ist beginnend von dem ersten Nukleotid der AUR1 cDNA zu AUR1 homolog. Direkt stromaufwärts dieser Stelle liegt die vorhergesagte Haarnadelschleife von AUR3. Wir charakterisieren zur Zeit genomische AUR1 Klone, um zu bestimmen ob sich die Homologie zu AUR3 stromaufwärts von diesem Nukleotid fortsetzt und ob die AUR1 cDNA eine ähnliche Haarnadelschleife einschließt oder diese der AUR1 cDNA vorausgeht.

[0011] Der Nutzen der vorliegenden Erfindung schließt die Möglichkeit ein, nach Inhibitoren des Zellwachstums zu suchen und auf Basis kleiner Moleküle Therapeutika für die Behandlung von Krebs zu entwickeln.

[0012] Daher bietet die Erfindung in einem ersten Aspekt ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes Nukleinsäuremolekül, dadurch charakterisiert, dass es ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 3 gezeigt ist oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 4 gezeigt ist, kodiert.

[0013] Mit „isoliert“ in Bezug auf Nukleinsäuren ist ein Polymer von Nukleotiden, die miteinander konjugiert sind, einschließlich DNA oder RNA, gemeint, das aus einer natürlichen Quelle isoliert oder synthetisiert wird. In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung sind längere Nukleinsäuren bevorzugt, zum Beispiel solche mit 600, 900 oder mehr Nukleotiden und/oder solche, die mindestens 50%, 60%, 75%, 90%, 95% oder 99% Identität mit der Vollängensequenz, die in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 gezeigt ist, besitzen. Die isolierte Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung ist in dem Sinne einzigartig, dass sie nicht in einem reinen oder getrennten Zustand in der Natur gefunden wird. Die Verwendung des Ausdrucks „isoliert“ zeigt an, dass eine natürlich auftretende Sequenz aus ihrer normalen zellulären (d.h. chromosomalen) Umgebung entfernt wurde. Daher kann diese Sequenz in einer zellfreien Lösung sein oder in einer anderen zellulären Umgebung platziert worden sein. Der Ausdruck beinhaltet nicht, dass die Sequenz die einzige vorhandene Nukleotidkette ist, sondern dass sie im wesentlichen frei (mindestens ungefähr 90 bis 95% rein) ist von Nicht-Nukleotidmaterial, das natürlicherweise mit ihr assoziiert ist, und ist somit beabsichtigt die Unterscheidung von isolierten Chromosomen zu ermöglichen.

[0014] Durch die Verwendung des Ausdrucks „angereichert“ in Bezug auf Nukleinsäuren ist gemeint, dass die spezifische DNA- oder RNA-Sequenz einen signifikant höheren Anteil (2-5-fach) der Gesamt-DNA oder -RNA, die in den Zellen oder der Lösung von Interesse vorhanden ist, darstellt, als in normalen oder kranken Zellen oder den Zellen, aus denen die Sequenz entnommen wurde. Das kann von einer Person durch präferentielle Reduktion der Menge anderer vorhandener RNA oder DNA verursacht werden oder durch präferentielle Steigerung der Menge an spezifischer DNA- oder RNA-Sequenz oder durch eine Kombination von beiden. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass „angereichert“ nicht beinhaltet, dass es keine anderen vorhandenen DNA- oder RNA-Sequenzen gibt, sondern dass die relative Menge der Sequenz von Interesse signifikant erhöht worden ist. Der Ausdruck „signifikant“ wird hier verwendet, um anzuzeigen, dass der Grad des Anstiegs für die Person, die solch einen Anstieg durchführt, nützlich ist und bedeutet im allgemeinen relativ zu anderen Nukleinsäuren einen Anstieg von ungefähr mindestens 2-fach, bevorzugter mindestens 5 bis 10-fach oder sogar mehr. Der Ausdruck beinhaltet ebenfalls nicht, dass keine DNA oder RNA aus anderen Quellen vorhanden ist.

Die DNA aus anderen Quellen kann zum Beispiel DNA aus einem Hefe- oder Bakteriengenom oder einem Klonierungsvektor, wie zum Beispiel pUC19, umfassen. Dieser Ausdruck dient der Unterscheidung von natürlich auftretenden Ereignissen, wie zum Beispiel einer Vireninfektion oder tumorartigem Wachstum, in denen der Level einer mRNA relativ zu anderen Arten von mRNA natürlich erhöht sein kann. Das heißt, es ist beabsichtigt, dass der Ausdruck nur solche Situationen abdeckt, in denen eine Person eingegriffen hat, um den Anteil der gewünschten Nukleinsäure zu erhöhen.

[0015] Für manche Zwecke ist es ebenfalls vorteilhaft, dass eine Nukleotidsequenz in gereinigter Form vorliegt. Der Ausdruck „gereinigt“ mit Bezug auf Nukleinsäuren erfordert keine absolute Reinheit (wie zum Beispiel eine homogene Herstellung), sondern stellt einen Hinweis darauf dar, dass die Sequenz relativ gesehen reiner ist, als in der natürlichen Umgebung (verglichen mit dem natürlichen Level sollte dieser Level mindestens 2-5-fach größer, z. B. hinsichtlich mg/ml, sein). Aus einer cDNA Bibliothek isolierte individuelle Klone können bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Die beanspruchten DNA-Moleküle, die aus diesen Klonen erhalten werden, können direkt aus der Gesamt-DNA oder aus der Gesamt-RNA erhalten werden. Die cDNA Klone treten nicht natürlich auf, sondern werden vielmehr vorzugsweise über die Manipulation einer teilweise gereinigten natürlich auftretenden Substanz (Boten-RNA) erhalten. Die Erstellung einer cDNA Bibliothek aus mRNA schließt die Erzeugung einer synthetischen Substanz (cDNA) ein und reine cDNA Einzelklone können durch klonale Selektion der Zellen, die die cDNA-Bibliothek tragen, aus der synthetischen Bibliothek isoliert werden. Daher erzielt ein Verfahren, welches das Erstellen einer cDNA-Bibliothek aus mRNA und die Isolierung von unterschiedlichen cDNA-Klonen einschließt, eine ungefähr 10^6 -fache Reinigung der nativen Information. Daher ist eine Reinigung um mindestens eine Größenordnung, vorzugsweise zwei oder drei Größenordnungen und noch bevorzugter vier oder fünf Größenordnungen ausdrücklich beabsichtigt.

[0016] Mit „einem AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid“ sind 100 oder mehr zusammenhängende Aminosäuren, die in der Volllängenamino-säuresequenz SEQ ID Nr: 3 oder SEQ ID Nr: 4 dargestellt sind, oder ein funktionales Derivat davon, wie hierin beschrieben, gemeint. In bestimmten Aspekten werden Polypeptide mit 200, 300 oder mehr Aminosäuren bevorzugt. Das AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kann durch eine Volllängen-nukleinsäuresequenz oder jeden Teil der Volllängen-nukleinsäuresequenz kodiert werden, solange die funktionale Aktivität des Polypeptids beibehalten wird.

[0017] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst, besteht im wesentlichen aus oder besteht die isolierte Nukleinsäuresequenz aus einer Nukleinsäuresequenz, die in der Volllängenamino-säuresequenz mit der SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 4 dargelegt ist, einem funktionellen Derivat davon, oder kodiert mindestens 200 oder 300 zusammenhängende Aminosäuren davon.

[0018] Die Nukleinsäure kann durch cDNA-Klonierung oder subtraktive Hybridisierung aus einer natürlichen Quelle isoliert werden; die natürliche Quelle kann Säugetier(menschliches)-Blut, -Samen oder -Gewebe sein oder die Nukleinsäure kann durch das Triesterverfahren oder unter Verwendung eines automatisierten DNA-Synthetisierers synthetisiert werden. In noch anderen bevorzugten Ausführungsformen ist die Nukleinsäure eine konservierte oder einzigartige Region, zum Beispiel eine, die für die Herstellung von Hybridisierungssonden, um die Identifikation und Klonierung von zusätzlichen Polypeptiden zu erleichtern, den Entwurf von PCR-Sonden, um das Klonieren zusätzlicher Polypeptide zu erleichtern und Antikörper gegen Polypeptid-regionen zu erhalten, nützlich ist.

[0019] Beispiele von Aminosäuresequenzen schließen die folgenden Aminosäuresequenzen ein
 ENSYPWPYGRQ (SEQ ID Nr: 5)
 CISGP (SEQ ID Nr: 6)
 QFPO (SEQ ID Nr: 7)
 VN SGQ (SEQ ID Nr: 8)
 RKEPVTPSA-LV (SEQ ID Nr: 9)
 LMSRSNVQPTAAP (SEQ ID Nr: 10)
 VQNQKQKQLQATSVPH (SEQ ID Nr: 11)
 PVSRLNNTQK (SEQ ID Nr: 12)
 VMENSSGTPD (SEQ ID Nr: 13)
 ILTRHFTID (SEQ ID Nr: 14)
 SKQLPSAPENNPEEQLASKQK (SEQ ID Nr: 15)

[0020] Mit "konservierten Nukleinsäureregionen" sind Regionen gemeint, die in zwei oder mehr Nukleinsäuren, die ein AUR-1 und/oder ein AUR-2 Polypeptid kodieren, vorhanden sind, und an die eine bestimmte Nukleinsäuresequenz unter Bedingungen niedriger Stringenz hybridisieren kann. Beispiele für Bedingungen nied-

riger Stringenz, die für die Suche nach Nukleinsäuren, die AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptide kodieren, geeignet sind, werden in Abe, et al. J. Biol. Chem., 19:13361 (1992) zur Verfügung gestellt.

[0021] Vorzugsweise unterscheiden sich konservierte Regionen in nicht mehr als 5 von 20 Nukleotiden.

[0022] Mit „einzigartiger Nukleinsäureregion“ ist eine Sequenz gemeint, die in einer Volllängennukleinsäure, die für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kodiert, vorhanden ist, und die nicht in einer Sequenz vorhanden ist, die für irgendein anderes natürlich auftretendes Polypeptid kodiert. Solche Regionen umfassen vorzugsweise 30 oder 45 zusammenhängende Nukleotide, die in der Volllängennukleinsäure, die ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kodiert, vorhanden sind. Insbesondere ist der Ursprung einer einzigartigen Nukleinsäureregion vorzugsweise ein Säugetier.

[0023] Die Erfindung betrifft ebenfalls eine Nukleinsäuresonde für den Nachweis eines AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptids oder einer Nukleinsäure, die ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kodiert, in einer Probe. Die Nukleinsäuresonde enthält Nukleinsäure, die an eine Sequenz, die in SEQ ID No: 1 oder SEQ ID No: 2 dargelegt ist oder funktionale Derivate davon, hybridisiert.

[0024] Die Nukleinsäuresonde ist zu einer Nukleinsäure, die mindestens 105, 120, 150, 200, 250, 300 oder 350 zusammenhängende Aminosäuren der Volllängensequenz kodiert, die in SEQ ID No: 1 oder SEQ ID No: 2 dargelegt ist oder einem funktionellen Derivat davon, hochkomplementär. Abhängig von der gewünschten Spezifität und Selektivität können verschiedene Hybridisierungsbedingungen niedriger oder hoher Stringenz verwendet werden. Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren nur hochkomplementäre Nukleinsäuresequenzen. Vorzugsweise verhindern solche Bedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren, die in 20 zusammenhängenden Nukleotiden 1 bis 2 Fehlpaarungen besitzen.

[0025] Verfahren für die Verwendung der Sonden schließen den Nachweis der Anwesenheit oder der Menge von AUR-1 und/oder AUR-2 RNA in einer Probe durch das Inkontaktbringen der Probe mit einer Nukleinsäuresonde unter Bedingungen, so dass die Hybridisierung erfolgt, und den Nachweis der Anwesenheit oder der Menge der Sonde, die an AUR-1 und/oder AUR-2 RNA gebunden ist, ein. Die Duplex-Nukleinsäure, die sich aus der Sonde und einer Nukleinsäuresequenz, die für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kodiert, bildet, kann für die Identifikation der Sequenz der nachgewiesenen Nukleinsäure verwendet werden (siehe beispielsweise Nelson et al., in Nonisotopic DNA Probe Techniques, p. 275 Academic Press, San Diego (Kricka, ed., 1992)).

[0026] Kits zum Durchführen solcher Verfahren können so ausgestaltet werden, dass sie einen Behälter, in dem sich eine Nukleinsäuresonde befindet, einschließen.

[0027] Die Erfindung bietet ebenfalls rekombinante Nukleinsäuren, die mindestens 100 zusammenhängende Aminosäuren der Sequenz, die in SEQ ID Nr: 3 oder SEQ ID Nr: 4 dargelegt ist, oder ein funktionelles Derivat davon kodieren und einen Vektor oder einen Promoter, der beim Initiieren der Transkription in einer Wirtszelle wirksam ist. Die rekombinante Nukleinsäure kann alternativ eine Transkriptionsinitiationsregion, die in einer Zelle funktionell ist, eine Sequenz, die zu einer RNA-Sequenz, die ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kodiert, komplementär ist und eine Transkriptionsterminationsregion, die in einer Zelle funktionell ist, enthalten.

[0028] In einem anderen Aspekt liefert die Erfindung ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid.

[0029] Mit „isoliert“ mit Bezug auf ein Polypeptid ist ein Polymer von 100 oder mehr zusammenhängenden Aminosäuren einer Sequenz, die in SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 4 dargelegt ist, und die miteinander verbunden sind gemeint, einschließlich Polypeptide die aus einer natürlichen Quelle isoliert oder synthetisiert werden. In bestimmten Aspekten werden längere Polypeptide bevorzugt, wie zum Beispiel solche mit 402, 407, 413 oder 425 zusammenhängenden Aminosäuren, wie in SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 4 dargelegt. Die isolierten Polypeptide der vorliegenden Erfindung sind in dem Sinne einzigartig, dass sie in einem reinen oder abgetrennten Zustand in der Natur nicht gefunden werden. Die Verwendung des Ausdrucks „isoliert“ zeigt an, dass eine natürlich auftretende Sequenz aus ihrer normalen zellulären Umgebung entfernt worden ist. Daher kann sich die Sequenz in einer zellfreien Lösung oder in einer anderen zellulären Umgebung befinden. Der Ausdruck beinhaltet nicht, dass die Sequenz die einzige vorhandene Aminosäurekette ist, sondern dass sie im wesentlichen frei (mindestens ungefähr 90-95% rein) von Nicht-Aminosäurematerial ist, das natürlicherweise damit assoziiert ist.

[0030] Mit der Verwendung des Ausdrucks „angereichert“ mit Bezug auf ein Polypeptid ist gemeint, dass die spezifische Aminosäuresequenz einen signifikant höheren Anteil (2-5 fach) der gesamten Aminosäuren, die in den Zellen oder der Lösung von Interesse vorhanden sind, darstellt, als in normalen oder kranken Zellen oder in den Zellen, aus denen die Sequenz entnommen wurde. Das kann durch eine Person durch die bevorzugte Verringerung der Menge anderer vorhandener Aminosäuren verursacht werden oder durch eine bevorzugte Anreicherung der Menge der spezifischen Aminosäuresequenz von Interesse oder durch eine Kombination der beiden. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass „angereichert“ nicht beinhaltet, dass keine anderen Aminosäuresequenzen vorhanden sind, sondern dass die relative Menge der Sequenz von Interesse signifikant erhöht worden ist. Der Ausdruck „signifikant“ wird hier verwendet, um anzuzeigen, dass der Grad des Anstiegs für die Person, die so einen Anstieg hervorruft, nützlich ist, und meint im allgemeinen relativ zu anderen Aminosäuren einen Anstieg von mindestens ungefähr 2-fach, bevorzugter mindestens 5 bis 10-fach oder noch mehr. Der Ausdruck beinhaltet ebenfalls nicht, dass keine Aminosäuren aus anderen Quellen vorhanden sind. Die Aminosäuren aus anderen Quellen können zum Beispiel Aminosäuren umfassen, die von einem Hefe- oder Bakteriengenom oder einem Klonierungsvektor, wie zum Beispiel pUC19, kodiert werden. Der Ausdruck ist gedacht nur solche Situationen abzudecken, in denen der Mensch eingegriffen hat, um den Anteil der gewünschten Nukleinsäure zu erhöhen.

[0031] Es ist ebenfalls für manche Zwecke vorteilhaft, dass die Aminosäuresequenz in gereinigter Form vorliegt. Der Ausdruck „gereinigt“ mit Bezug auf ein Polypeptid erfordert nicht absolute Reinheit (wie zum Beispiel eine homogene Herstellung); stattdessen stellt er einen Hinweis darauf dar, dass die Sequenz relativ reiner als in der natürlichen Umgebung ist (verglichen mit dem natürlichen Level sollte dieser Level, z. B. hinsichtlich mg/ml, mindestens 2-5-fach größer sein). Eine Reinigung von mindestens einer Größenordnung, vorzugsweise zwei oder drei Größenordnungen und noch bevorzugter vier oder fünf Größenordnungen ist ausdrücklich beabsichtigt. Die Substanz ist auf einem funktionell signifikanten Level vorzugsweise frei von Verunreinigungen, zum Beispiel 90%, 95% oder 99% rein.

[0032] In bevorzugten Ausführungsformen enthält das AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid mindestens 200, 250, 300 oder 350 zusammenhängende Aminosäuren der Vollängensequenz, die in SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 4 dargestellt ist, oder funktionelle Derivate davon.

[0033] In noch einem anderen Aspekt bietet die Erfindung einen Antikörper (zum Beispiel einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper), der eine spezifische Bindungsaffinität für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid besitzt. Der Antikörper enthält eine Sequenz von Aminosäuren, die in der Lage ist, spezifisch an ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid zu binden, das mindestens 100 zusammenhängende Aminosäuren der Vollängensequenz, die in SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 4 dargelegt ist, enthält. Mit „spezifischer Bindungsaffinität“ ist gemeint, dass der Antikörper unter bestimmten Bedingungen an AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptide mit größerer Affinität bindet als an andere Polypeptide.

[0034] Antikörper, die eine spezifische Bindungsaffinität für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid besitzen, können in Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit und/oder der Menge eines AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptids in einer Probe durch das Inkontaktbringen der Probe mit dem Antikörper unter Bedingungen, unter denen ein Immunkomplex gebildet wird, und den Nachweis der Anwesenheit und/oder der Menge des Antikörpers der an das AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid konjugiert ist, verwendet werden. Diagnostische Kits zum Durchführen solcher Verfahren können so ausgestaltet werden, dass sie einen ersten Behälter, der einen Antikörper enthält, und einen zweiten Behälter, der ein Konjugat aus einem Bindungspartner des Antikörpers und einem Marker enthält, einschließen.

[0035] In einem anderen Aspekt bietet die Erfindung ein Hybridom, das einen Antikörper produziert, der eine spezifische Bindungsaffinität für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid besitzt, das mindestens 100 zusammenhängende Aminosäuren der Vollängensequenz, die in SEQ ID No: 3 oder SEQ ID No: 4 dargelegt ist, besitzt. Mit „Hybridom“ ist eine immortalisierte Zelllinie gemeint, die in der Lage ist einen Antikörper, zum Beispiel einen AUR-1 und/oder AUR-2 Antikörper, zu sekretieren.

[0036] Mit „gereinigt“ mit Bezug auf einen Antikörper ist gemeint, dass der Antikörper von natürlich auftretenden Antikörpern abgetrennt ist, wie zum Beispiel in gereinigter Form. Vorzugsweise wird der Antikörper als homogenes Präparat durch Standardtechniken bereitgestellt. Die Verwendung von Antikörpern gegen die klonierten Polypeptide schließt solche ein, die als Therapeutika oder diagnostische Werkzeuge verwendet werden sollen.

[0037] Die Erfindung bietet ein Verfahren zur Suche nach menschlichen Zellen, die ein AUR-1 und/oder

AUR-2 Polypeptid oder eine äquivalente Sequenz enthalten. Das Verfahren schließt das Identifizieren der neuen Polypeptide in menschlichen Zellen unter Verwendung von Techniken ein, die auf dem Gebiet Routine und Standard sind, wie zum Beispiel solche die hierin zur Identifizierung von AUR-1 und/oder AUR-2 beschrieben sind (m, Klonierung, Southern oder Northern Blot Analyse, in situ Hybridisierung, PCR-Amplifikation, etc.).

[0038] In einem anderen Aspekt bietet die Erfindung einen Assay, um Mittel zu identifizieren, die in der Lage sind die Interaktion zwischen AUR-1 und/oder AUR-2 und einem AUR-1 und/oder AUR-2 Bindungspartner zu stören. Solche Assays können in vitro oder in vivo durchgeführt werden und sind hierin detailliert beschrieben oder können durch das Modifizieren von bestehenden Assays, wie zum Beispiel dem Wachstumsassay, der in Serien-Nummer 08/487,088, eingereicht am 07. Juni 1995, oder in den Assays, die in Serien-Nr. 60/005,167, eingereicht am 13. Oktober 1995 beschrieben sind, erhalten werden. Ein anderer Assay der modifiziert werden kann, um die Gene der vorliegenden Erfindung zu verwenden, wird in der internationalen Anmeldung Nr. WO 94/23039, veröffentlicht am 13. Oktober 1994, beschrieben. Andere Möglichkeiten schließen den Nachweis der Kinaseaktivität in einem Autophosphorylierungs-Assay oder das Testen der Kinaseaktivität an Standardsubstraten, wie zum Beispiel Histonen, basischem Myelin-Protein, Gamma-Tubulin oder zentrosomalen Proteinen ein. Bindungspartner können durch den Einsatz des N-terminalen Teils des Proteins in einem Two-hybrid-Screen oder den Nachweis des Phosphotyrosins einer Kinase doppelter Spezifität identifiziert werden. Fields and Song, U.S. Patent Nr. 5,283,173, erteilt am 01. Februar 1994.

[0039] Ein Mittel, durch das Inhibitoren der Auroraaktivität bestimmt werden können, ist ein Screening-System, das eine Temperatur sensitive Hefemutante verwendet, wie von Chan und Botstein beschrieben (Genetics 135:677-691, 1993); siehe ebenfalls Francisco et al., Mol. Cell. Bio. 14(7):4731-4740, 1994).

[0040] In Kürze, der Hefestamm CCY72-3D-1 (ipl 1-2), der eine Temperatur-sensitive Form des Hefehomologs von Aurora (ip11) exprimiert ist, obwohl bei 26°C wachstumsfähig bei 37°C nicht wachstumsfähig. Transfektion dieses Stammes mit einem Expressionsplasmid, das ein Aurora Hybrid-Gen enthält, das aus dem N-terminalen Teil von ip11, der die vermeintliche Substratinteraktionsdomäne(n) enthält und dem C-terminalen Teil von Aurora 1 oder 2, der die katalytische Domäne enthält, besteht, überwindet diese Sensitivität gegenüber der Wachstumstemperatur. Der Aurora-exprimierende Hefestamm wird dann bei 37°C in Gegenwart einer Testsubstanz wachsen gelassen. In der Gegenwart von Substanzen, die die katalytische Funktion von Aurora inhibieren, wird kein Wachstum zu bemerken sein. Potentielle Inhibitoren schließen Chemikalien mit niedrigem Molekulargewicht und/oder natürliche Produkte, die aus verschiedenen Organismen, wie zum Beispiel Pilzen, marinen Organismen, Pflanzen, etc. isoliert wurden, ein.

[0041] Die Zusammenfassung der oben beschriebenen Erfindung ist nicht beschränkend und andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen und aus den Ansprüchen ersichtlich.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0042] Die folgende Erfindung bezieht sich auf AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptide, Nukleinsäuren, die solche Polypeptide kodieren, Antikörper gegen solche Polypeptide, Assays, die solche Polypeptide verwenden, und Verfahren, die sich auf alle vorhergehenden beziehen.

I. Nukleinsäuren, die AUR-1 und AUR-2 Polypeptide kodieren

[0043] Eingeschlossen im Umfang dieser Erfindung sind die funktionalen Äquivalente der hierin beschriebenen isolierten Nukleinsäuremoleküle. Die Degeneration des genetischen Codes erlaubt die Substitution bestimmter Codons durch andere Codons, die dieselbe Aminosäure spezifizieren und ferner dasselbe Protein hervorbringen würden. Die Nukleinsäuresequenz kann wesentlich variieren, da mit der Ausnahme von Methionin und Tryptophan die bekannten Aminosäuren von mehr als einem Codon kodiert werden können. Daher können Teile des oder das gesamte AUR-1 und/oder AUR-2 Gen(s) synthetisiert werden, um eine Nukleinsäuresequenz zu ergeben, die sich signifikant von der, die in SEQ ID No:1 oder SEQ ID No:2 gezeigt ist, unterscheidet. Die davon kodierte Aminosäuresequenz würde jedoch konserviert bleiben.

[0044] Zusätzlich kann die Nukleinsäuresequenz eine Nukleotidsequenz umfassen, die sich aus der Addition, Deletion oder Substitution von mindestens einem Nukleotid an das 5'-Ende und/oder das 3'-Ende der Nukleinsäureformel, die in SEQ ID No:1 oder SEQ ID No:2 gezeigt ist, oder einem Derivat davon ergibt. Auf diese Weise kann jedes Nukleotid oder Polynukleotid verwendet werden, vorausgesetzt, dass seine Addition, Deletion oder Substitution die Aminosäuresequenz aus SEQ ID No:3 oder SEQ ID No:4, die durch die Nukleotid-

sequenz kodiert wird, nicht verändert. Es ist zum Beispiel beabsichtigt, dass die vorliegende Erfindung jede Nukleinsäuresequenz, die sich aus der Addition von ATG als Startcodon an das 5'-Ende der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder ihrem Derivat oder aus der Addition von TTA, TAG oder TGA als Stoppcodon an das 3'-Ende der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz oder ihrem Derivat ergibt, einschließt. Außerdem kann das Nukleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung, falls notwendig, Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen zu seinem 5'-Ende und/oder 3'-Ende hinzugefügt haben.

[0045] Solche funktionellen Veränderungen einer gegebenen Nukleinsäuresequenz bieten die Gelegenheit die Sekretion und/oder das Prozessieren von heterologen Proteinen, die durch fremde daran fusionierte Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, zu begünstigen. Alle Variationen der Nukleotidsequenz des AUR-1 und/oder AUR-2 Gens und Fragmenten davon, die durch den genetischen Code erlaubt werden, sind daher in dieser Erfindung eingeschlossen.

[0046] Es ist ferner möglich, Codons zu deletieren oder ein oder mehrere Codons durch andere als degenerierte Codons zu ersetzen, um ein strukturell modifiziertes Polypeptid zu erzeugen, das aber im wesentlichen dieselbe Wirksamkeit oder Aktivität wie das Polypeptid besitzt, das durch das unmodifizierte Nukleinsäuremolekül erzeugt wird. Wie im Stand der Technik bekannt ist, sind diese zwei Polypeptide wie auch die beiden Nukleinsäuremoleküle, die ihre Produktion ermöglichen, funktionell äquivalent, obwohl die Unterschiede zwischen den Nukleinsäuremolekülen nicht auf die Degeneration des genetischen Codes zurückzuführen sind.

II. Eine Nukleinsäuresonde für die Detektion von AUR-1 und/oder AUR-2.

[0047] Eine Nukleinsäuresonde der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um eine geeignete chromosomale oder cDNA-Bibliothek durch die üblichen Hybridisationsverfahren zu untersuchen, um andere Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung zu erhalten. Eine chromosomale DNA oder cDNA-Bibliothek kann aus den entsprechenden Zellen gemäß Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, hergestellt werden (vgl. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, second edition, edited by Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

[0048] Als Alternative wird eine chemische Synthese durchgeführt, um Nukleinsäuresonden zu erhalten, die Nukleotidsequenzen besitzen, die N-terminalen und C-terminalen Teilen der Aminosäuresequenz des Polypeptids von Interesse entsprechen. So können die synthetisierten Nukleinsäuresonden unter Verwendung der geeigneten chromosomalen oder cDNA-Bibliothek als Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) in Übereinstimmung mit anerkannten PCR-Techniken, im wesentlichen gemäß PCR-Protokollen, „A Guide to Methods and Applications“, editiert von Michael et al., Academic Press, 1990, verwendet werden, um ein Fragment der vorliegenden Erfindung zu erhalten.

[0049] Der Durchschnittsfachmann kann basierend auf der hierin offenbarten Sequenz unter Verwendung von Verfahren des Computer Alignment und der Sequenzanalyse, die im Stand der Technik bekannt sind (vgl. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, second edition, editiert von Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) solche Sonden einfach entwerfen. Die Hybridisierungssonden der vorliegenden Erfindung können mittels Standardtechniken zur Markierung zum Beispiel mit einem radioaktiven Marker, einem Enzymmarker, einem Fluoreszenzmarker, einem Biotin-Avidin-Marker, einem Chemolumineszenzmarker und ähnlichem markiert sein. Nach der Hybridisierung können die Sonden unter Verwendung bekannter Verfahren sichtbar gemacht werden.

[0050] Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung schließen RNA sowie DNA-Sonden ein, wobei solche Sonden unter Verwendung von Techniken, die im Stand der Technik bekannt sind, erzeugt werden. Die Nukleinsäuresonde kann auf einem festen Träger immobilisiert sein. Beispiele von solchen festen Trägern schließen ein, aber sind nicht begrenzt auf Kunststoffe, wie zum Beispiel Polycarbonate, komplexe Kohlenhydrate, wie zum Beispiel Agarose und Sepharose und Acrylharze, wie zum Beispiel Polyacrylamid und Latexkugeln. Techniken für das Kopplung von Nukleinsäuresonden an solche festen Träger sind im Stand der Technik gut bekannt.

[0051] Die Testproben, die für die Nukleinsäurenachweisverfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schließen zum Beispiel Zellen oder Nukleinsäureextrakte von Zellen oder biologischen Flüssigkeiten ein. Die in den oben beschriebenen Verfahren verwendete Probe wird basierend auf dem Assay-Format, dem Nachweisverfahren und der Natur des Gewebes, der Zellen oder Extrakte, die untersucht werden sollen, variieren. Verfahren zum Herstellen von Nukleinsäureextrakten aus Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt und können, um eine Probe zu erhalten, die mit dem verwendeten Verfahren kompatibel ist, einfach angepasst

werden.

III. Ein Sonden basiertes Verfahren und ein Kit für den Nachweis von AUR-1 und/oder AUR-2.

[0052] Ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit von AUR-1 und/oder AUR-2 in einer Probe umfasst (a) das Inkontaktbringen besagter Probe mit der oben beschriebenen Nukleinsäuresonde unter Bedingungen, dass eine Hybridisierung erfolgt und (b) Nachweis der Anwesenheit der an das Nukleinsäuremolekül gebundenen Sonde. Der Durchschnittsfachmann würde die Nukleinsäuresonde gemäß den im Stand der Technik bekannten Techniken wie oben beschrieben auswählen. Zu testende Proben schließen ein aber sollten nicht begrenzt werden auf RNA-Proben aus menschlichem Gewebe.

[0053] Ein Kit zum Nachweis der Anwesenheit von AUR-1 und/oder AUR-2 in einer Probe umfasst mindestens einen Behälter, der die oben beschriebene Nukleinsäuresonde enthält. Der Kit kann ferner andere Behälter umfassen, die ein oder mehrere der folgenden beinhalten: Waschreagenzien und Reagenzien, die in der Lage sind, die Gegenwart von gebundener Nukleinsäuresonde nachzuweisen. Beispiele von Nachweisreagenzien schließen ein aber sind nicht begrenzt auf radiomarkierte Sonden, enzymatisch markierte Sonden (Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase) und Affinitäts-markierte Sonden (Biotin, Avidin oder Streptavidin).

[0054] Im Einzelnen schließt ein aufgeteilter Kit jeden Kit ein, in dem die Reagenzien in separaten Behältern enthalten sind. Solche Behälter schließen kleine Glasbehälter, Kunststoffbehälter oder Kunststoff- oder Papierstreifen ein. Solche Behälter erlauben die wirkungsvolle Übertragung von Reagenzien aus einem Behälter in ein anderes Behältnis, so dass die Proben und Reagenzien nicht kreuzkontaminiert und die Mittel oder Lösungen aus jedem Behälter in quantitativer Weise von einem Behälter in ein anderes zugegeben werden können. Solche Behälter schließen einen Behälter ein, der die Testprobe aufnehmen kann, einen Behälter, der die Sonde oder die Primer enthält, die in dem Assay verwendet werden, Behälter, die Waschreagenzien (wie zum Beispiel Phosphat gepufferte Salzlösung, Trispuffer und ähnliche) enthalten, und Behälter, die die Reagenzien enthalten, die verwendet werden um die hybridisierte Sonde, den gebundenen Antikörper, das amplifizierte Produkt oder ähnliches nachzuweisen. Der Durchschnittsfachmann wird leicht erkennen, dass die Nukleinsäuresonden, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, einfach in eines der bekannten Kitformate, die im Stand der Technik gut bekannt sind, eingebaut werden können.

IV. DNA-Konstrukte, die ein AUR-1 und/oder AUR-2 Nukleinsäuremolekül umfassen und Zellen, die diese Konstrukte enthalten.

[0055] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf ein rekombinantes DNA-Molekül, das von 5' nach 3' einen Promoter, der wirksam ist in einer Wirtszelle die Transkription zu initiieren, und das oben beschriebene Nukleinsäuremolekül umfasst. Zusätzlich bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein rekombinantes DNA-Molekül, das einen Vektor und ein oben beschriebenes Nukleinsäuremolekül umfasst. Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf ein Nukleinsäuremolekül, das eine Transkriptionsregion umfasst, die in einer Zelle funktionell ist, eine Sequenz, die zu einer RNA-Sequenz, die eine Aminosäuresequenz, die dem oben beschriebenen Polypeptid entspricht, komplementär ist und eine Transkriptionsterminationsregion, die in besagter Zelle funktionell ist. Die oben beschriebenen Moleküle können isolierte und/oder gereinigte DNA-Moleküle sein.

[0056] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf eine Zelle oder einen Organismus, der ein oben beschriebenes Nukleinsäuremolekül enthält und dadurch in der Lage ist ein Peptid zu exprimieren. Das Polypeptid kann aus Zellen, die verändert wurden, um das Polypeptid zu exprimieren, gereinigt werden. Von einer Zelle wird gesagt, dass sie „verändert wurde um ein gewünschtes Polypeptid zu exprimieren“, wenn die Zelle durch genetische Manipulation dazu gebracht wird ein Protein herzustellen, das sie normalerweise nicht herstellt oder das die Zellen normalerweise in geringerer Menge herstellt. Der Durchschnittsfachmann kann Verfahren für das Einführen und Exprimieren von entweder genomischer, cDNA oder synthetischen Sequenzen sowohl in eukaryotische als auch prokaryotische Zellen einfach anpassen.

[0057] Ein Nukleinsäuremolekül, wie zum Beispiel DNA, wird als „fähig zur Expression“ eines Polypeptids bezeichnet, wenn es Nukleotidsequenzen enthält, die regulatorische Transkriptions- und Translations-Informationen enthalten und solche Sequenzen mit Nukleotidsequenzen, die das Polypeptid kodieren, „funktionell verbunden sind“. Eine funktionelle Verbindung ist eine Verbindung, in welcher die regulatorischen DNA-Sequenzen und die zu exprimierende DNA-Sequenz in einer Art verbunden sind, die die Expression der Gensequenz erlaubt. Die genaue Natur der regulatorischen Regionen, die für die Expression von Gensequenzen gebraucht

werden, kann von Organismus zu Organismus variieren aber sollte im allgemeinen eine Promoter-Region einschließen, die in Prokaryonten sowohl den Promoter (der die Initiation der RNA-Transkription steuert) als auch die DNA-Sequenzen, die, wenn in RNA transkribiert, den Synthesestart signalisieren, enthält. Solche Regionen schließen normalerweise die nicht-kodierenden 5' Sequenzen ein, die an der Initiation der Transkription und Translation beteiligt sind, wie zum Beispiel die TATA-Box, die Capping-Sequenz, die CAAT-Sequenz und ähnliche.

[0058] Falls gewünscht, kann mit den oben beschriebenen Verfahren die nicht-kodierende Region 3' zu der Sequenz, die ein AUR-1 und/oder AUR-2 Gen kodiert, erhalten werden. Diese Region kann aufgrund ihrer regulatorischen Sequenzen zur Transkriptionstermination, wie zum Beispiel Termination und Polyadenylierung beibehalten werden. So können durch das Beibehalten der 3'-Region, die natürlich mit der DNA-Sequenz, die ein AUR-1 und/oder AUR-2 Gen kodiert, zusammenhängt, die Transkriptionsterminationssignale bereitgestellt werden. Wo die Transkriptionsterminationssignale in der Expressionswirtszelle nicht ausreichend funktionell sind, können sie durch eine 3' Region, die in der Wirtszelle funktionell ist, ersetzt werden.

[0059] Von zwei DNA-Sequenzen (wie zum Beispiel einer Promoterregion-Sequenz und einer AUR-1 und/oder AUR-2 Sequenz) wird gesagt, dass sie funktionell verbunden sind, wenn die Art der Bindung zwischen den beiden DNA-Sequenzen nicht (1) zu der Einführung einer Frame-Shift Mutation führt, (2) die Fähigkeit der Promoterregionsequenz die Transkription einer AUR-1 und/oder AUR-2 Gensequenz zu steuern stört oder (3) die Fähigkeit einer AUR-1 und/oder AUR-2 Gensequenz durch die Promoterregionsequenz transkribiert zu werden stört. Somit würde eine Promoterregion funktionell mit einer DNA-Sequenz verbunden sein, wenn der Promoter in der Lage ist die Transkription dieser DNA-Sequenz auszulösen. Daher sind, um ein AUR-1 und/oder AUR-2 Gen zu exprimieren, Transkriptions- und Translations-Signale, die von einem entsprechenden Wirt erkannt werden, notwendig.

[0060] Die vorliegende Erfindung umfasst die Expression des AUR-1 und/oder AUR-2 Gens (oder einem funktionellen Derivat davon) sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen. Prokaryotische Wirte sind für die Herstellung von rekombinanten Proteinen im Allgemeinen sehr effizient und praktisch und daher eine Art bevorzugtes Expressionssystem für das AUR-1 und/oder AUR-2 Gen. Prokaryonten werden am häufigsten durch verschiedene Stämme von *E. coli* verkörpert. Es können jedoch auch andere mikrobielle Stämme, einschließlich anderer Bakterienstämme, verwendet werden.

[0061] In prokaryotischen Systemen können Plasmidvektoren, die Replikationsstellen und Kontrollsequenzen enthalten, die von einer Art abgeleitet sind, die mit dem Wirt kompatibel ist, verwendet werden. Beispiele von geeigneten Plasmidvektoren können pBR322, pUC118, pUC119 und ähnliche einschließen; geeignete Phagen oder Bakteriophagenvektoren können γ gt10, γ gt11 und ähnliche einschließen; und geeignete Virusvektoren können pMAM-neo, pKRC und ähnliche einschließen. Vorzugsweise hat der ausgewählte Vektor der vorliegenden Erfindung die Fähigkeit sich in der ausgewählten Wirtszelle zu replizieren.

[0062] Bekannte prokaryotische Wirte schließen Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* und ähnliche ein. Unter solchen Bedingungen wird das Peptid jedoch nicht glykosyliert. Der prokaryotische Wirt muss mit den Replikon- und Kontrollsequenzen im Expressionsplasmid kompatibel sein.

[0063] Um AUR-1 und/oder AUR-2 (oder ein funktionelles Derivat davon) in einer prokaryotischen Zelle zu exprimieren, ist es notwendig, die AUR-1 und/oder AUR-2 Sequenz mit einem funktionellen prokaryotischen Promoter funktionell zu verbinden. Solche Promoter können entweder konstitutiv oder noch bevorzugter regulierbar (d.h. induzierbar oder derepressierbar) sein. Beispiele von konstitutiven Promotoren schließen den Endpromoter des Bakteriophagen λ , den bla Promoter der β -Lactamase Gensequenz von pBR322 und den CAT-Promoter der Chloramphenicol Acetyl-Transferase Gensequenz von pBR325 und ähnliche ein. Beispiele von induzierbaren prokaryotischen Promotoren schließen die rechten und linken Hauptpromotoren des Bakteriophagen λ (P_L und P_R), den trp, recA, lacZ, lacI und gal Promoter von *E. coli*, den α -Amylase (Ulmanen et al., *J. Bacteriol.* 162:176-182 (1985)) und den ζ -28-spezifischen Promoter von *B. subtilis* (Gilman et al., *Gene sequence* 32:11-20 (1984)), die Promotoren der Bakteriophagen von *Bacillus* (Gryczan, In: *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., NY (1982)), und *Streptomyces* Promotoren (Ward et al., *Mol. Genet.* 203:468-478 (1986)) ein. Prokaryotische Promotoren werden in einer Übersicht von Glick (*J. Ind. Microbiol.* 1:277-282 (1987)); Cenatiempo (*Biochimie* 68:505-516 (1986)); und Gottesman (*Ann. Rev. Genet.* 18:415-442 (1984)) behandelt.

[0064] Die richtige Expression in einer prokaryotischen Zelle erfordert ebenfalls die Anwesenheit einer Ribo-

som-Bindungsstelle stromaufwärts der Gensequenz-kodierenden Sequenz. Solche Ribosombindungsstellen sind zum Beispiel von Gold et al. offenbart (Ann. Rev. Microbiol. 35:365-404 (1981)). Die Auswahl von Kontrollsequenzen, Expressionsvektoren, Transformationsverfahren und ähnlichen hängen von der Art der Wirtszelle ab, die verwendet wird, um das Gen zu exprimieren. Wie hierin verwendet, können „Zelle“, „Zelllinie“ und „Zellkultur“ austauschbar verwendet werden und alle solchen Bezeichnungen schließen die Nachkommen ein. Daher schließen die Wörter „Transformanten“ oder „transformierte Zellen“ die primäre Zielzelle und davon abgeleitete Kulturen unabhängig von der Anzahl von Transfers ein. Es ist ebenfalls selbstverständlich, dass alle Nachfahren aufgrund absichtlicher oder versehentlicher Mutationen im DNA-Gehalt nicht genau identisch sein können. Wie definiert müssen mutierte Nachkommen jedoch dieselbe Funktionalität wie die ursprünglich transformierte Zelle besitzen.

[0065] Wirtszellen, die in den Expressionssystemen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind nicht streng begrenzt, vorausgesetzt dass sie für die Verwendung bei der Expression des AUR-1 und/oder AUR-2 Peptids von Interesse geeignet sind. Geeignete Wirte können häufig eukaryotische Zellen einschließen. Bevorzugte eukaryotische Wirte schließen zum Beispiel Hefe, Pilze, Insektenzellen, Säugetierzellen entweder in vivo oder in Zellkulturen ein. Säugetierzellen, die als Wirte nützlich sein können, schließen HeLa-Zellen, Zellen mit Fibroblastenursprung, wie zum Beispiel VERO oder CHO-K1, oder Zellen lymphoiden Ursprungs und ihre Derivate ein. Bevorzugte Säugetierwirtszellen schließen SP2/O und J558L sowie Neuroblastoma Zelllinien, wie zum Beispiel IMR 332, ein, die bessere Möglichkeiten für die richtige post-translationale Prozessierung bereitstellen können.

[0066] Zusätzlich sind als Wirte auch Pflanzenzellen und Kontrollsequenzen, die mit Pflanzenzellen kompatibel sind, wie zum Beispiel 35S und 19S des Blumenkohlmosaikvirus, der Nopalinsynthase Promoter und Polyadenylierungssignalsequenzen verfügbar. Ein anderer bevorzugter Wirt ist eine Insektenzelle, zum Beispiel die Drosophila-Larve. Wenn Insektenzellen als Wirte verwendet werden, kann der Alkohol Dehydrogenase-Promoter aus Drosophila verwendet werden. Rubin, Science 240:1453-1459 (1988). Alternativ können Baculovirus-Vektoren manipuliert werden, um große Mengen von AUR-1 und/oder AUR-2 in Insektenzellen zu exprimieren (Jasny, Science 238:1653 (1987); Miller et al., In: Genetic Engineering (1986), Setlow, J.K., et al., eds., Plenum, Vol. 8, pp. 277-297).

[0067] Jedes einer Reihe von Hefe Gensequenz-Expressionssystemen, das Promoter und Terminationselemente von aktiv exprimierten Gensequenzen, die für glykolytische Enzyme, die in großen Mengen produziert werden, wenn Hefen in Medien wachsen, die reich an Glukose sind, einschließt, kann verwendet werden. Bekannte glykolytische Gensequenzen können ebenfalls sehr wirksame Transkriptions-Kontrollsignale bereitstellen. Hefen bieten dadurch wesentliche Vorteile, dass sie auch post-translationale Peptidmodifikationen ausführen können. Es existieren eine Reihe von rekombinanten DNA-Strategien, die starke Promotersequenzen und hohe Anzahlen von Plasmidkopien verwenden, die für die Herstellung der gewünschten Proteine in Hefen verwendet werden können. Die Hefe erkennt leader-Sequenzen auf klonierten Säugetiergensequenzprodukten und sekretiert Peptide, die leader-Sequenzen (d.h. Prä-Peptide) tragen. Für einen Säugetierwirt sind für die Expression von AUR-1 und/oder AUR-2 mehrere mögliche Vektorsysteme erhältlich.

[0068] Eine große Anzahl von regulatorischen Sequenzen für die Transkription und Translation kann abhängig von der Natur des Wirtes verwendet werden. Die regulatorischen Signale für die Transkription und Translation können von viralen Quellen abgeleitet sein, wie zum Beispiel dem Adenovirus, bovinem Papilloma-Virus, Cytomegalovirus, Simian-Virus oder ähnlichen, wo die regulatorischen Signale mit einer bestimmten Gensequenz, die einen hohen Expressionslevel besitzt, assoziiert sind. Alternativ können Promoter von Säugetierexpressionsprodukten, wie zum Beispiel Actin, Collagen, Myosin und ähnlichen verwendet werden. Es können regulatorische Signale zur Transkriptionsinitiation ausgewählt werden, die die Repression der Aktivierung erlauben, so dass die Expression der Gensequenzen moduliert werden kann. Von Interesse sind regulatorische Signale, die temperatursensitiv sind, so dass durch das Variieren der Temperatur die Expression unterdrückt oder initiiert werden kann, oder die einer chemischen Regulation (wie zum Beispiel durch Metabolite) unterliegen.

[0069] Die Expression von AUR-1 und/oder AUR-2 in eukaryotischen Wirten erfordert die Verwendung von eukaryotischen regulatorischen Regionen. Solche Regionen schließen im allgemeinen eine Promoterregion ein, die ausreicht, um die Initiation der RNA-Synthese zu steuern. Bevorzugte eukaryotische Promoter schließen zum Beispiel die Promoter der Maus Metallothionein I Gensequenz (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288 (1982)); den TK-Promoter des Herpes-Virus (McKnight, Cell 31:355-365 (1982)); den SV40 early Promoter (Benoist et al., Nature (London) 290:304-310 (1981)); und den Hefe gal4 Gensequenzpromoter (Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975(1982); Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)

81:5951-5955 (1984)) ein.

[0070] Die Translation von eukaryotischer mRNA beginnt an dem Codon, das das erste Methionin kodiert. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft sicherzustellen, dass die Verbindung zwischen einem eukaryotischen Promoter und einer DNA-Sequenz, die AUR-1 und/oder AUR-2 (oder ein funktionelles Derivat davon) kodiert, kein dazwischen liegendes Codon enthält, das in der Lage ist ein Methionin zu kodieren (d.h. AUG). Die Anwesenheit von solchen Codons führt entweder zu der Bildung eines Fusionsproteins (wenn das AUG-Codon in dem gleichen Leserahmen wie die AUR-1 und/oder AUR-2 kodierende Sequenz ist) oder zu einer Frame-Shift Mutation (wenn das AUG-Codon nicht in demselben Leserahmen wie die AUR-1 und/oder AUR-2 kodierende Sequenz ist).

[0071] Ein AUR-1 und/oder AUR-2 Nukleinsäuremolekül und ein funktionell verbundener Promoter können in eine prokaryotische oder eukaryotische Empfängerzelle als ein sich nicht replizierendes DNA (oder RNA) Molekül, das entweder ein lineares Molekül, oder bevorzugter ein geschlossenes kovalent zirkularisiertes Molekül sein kann, eingeführt werden. Da solche Moleküle nicht in der Lage sind sich autonom zu replizieren, kann die Expression des Genes durch die transiente Expression der eingeführten Sequenz auftreten. Alternativ kann die permanente Expression durch die Integration der eingeführten DNA-Sequenz in das Wirtschromosom auftreten.

[0072] Es kann ein Vektor verwendet werden, der in der Lage ist die gewünschte Gensequenz in das Wirtszellchromosom zu integrieren. Zellen, die die eingeführte DNA stabil in ihre Chromosomen integriert haben, können durch das gleichzeitige Einführen von einem oder mehreren Markern, die die Selektion der Wirtszellen, die den Expressionsvektor enthalten, erlauben, selektiert werden. Der Marker kann bei einem auxotrophen Wirt für Prototrophie oder für Biozidresistenz, zum Beispiel gegen Antibiotika oder Schwermetalle, wie zum Beispiel Kupfer, oder ähnliches sorgen. Die wählbare Marker-Gensequenz kann entweder direkt an die zu exprimierende DNA-Sequenz gebunden werden oder durch Co-Transfektion in dieselbe Zelle eingeführt werden. Für die optimale Synthese von mRNA Einzelkettenbindungsprotein können auch zusätzliche Elemente erforderlich sein. Diese Elemente können Splice-Signale, sowie Transkriptionspromotoren, Enhancer und Terminationssignale einschließen. cDNA-Expressionsvektoren, die solche Elemente beinhalten, schließen solche ein, die durch Okayama, Molec. Cell. Biol. 3:280 (1983) beschrieben sind.

[0073] Die eingeführten Nukleinsäuremoleküle können in ein Plasmid oder viralen Vektor, der in der Lage ist sich in dem Empfängerwirt autonom zu replizieren, eingebaut werden. Für diesen Zweck kann jeder einer großen Auswahl von Vektoren verwendet werden. Wichtige Faktoren bei der Auswahl eines bestimmten Plasmids oder viralen Vektors schließen ein: die Einfachheit, mit der Empfängerzellen, die den Vektor enthalten, erkannt und von solchen Empfängerzellen, die den Vektor nicht enthalten, getrennt werden können, die Anzahl der Vektorkopien, die in einem bestimmten Wirt gewünscht sind, und ob es wünschenswert ist, in der Lage zu sein, den Vektor zwischen Wirtszellen von verschiedenen Arten „pendeln“ zu lassen.

[0074] Bevorzugte prokaryotische Vektoren schließen Plasmide, wie zum Beispiel solche, die in der Lage sind sich in E. coli zu replizieren (wie zum Beispiel pBR322, ColE1, psC101, pACYC 184, nVX) ein. Solche Plasmide sind zum Beispiel von Sambrook (cf. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, second edition, edited by Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)) offenbart. Bacillus-Plasmide schließen pC194, pC221, pT127 und ähnliche ein.

[0075] Solche Plasmide sind von Gryczan (In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY (1982), pp. 307-329) offenbart. Geeignete Streptomyces-Plasmide schließen p1J101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169:4177-4183 (1987)), und Streptomyces Bakteriophagen wie zum Beispiel ΦC31 (Chater et al., In: Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54) ein. Eine Übersicht über Pseudomonas-Plasmide erfolgte durch John et al. (Rev. Infect. Dis. 8:693-704 (1986)) und Izaki (Jpn. J. Bacteriol. 33:729-742 (1978)).

[0076] Bevorzugte eukaryotische Plasmide schließen zum Beispiel BPV, Vaccinia, SV40, 2-Mikron Circle und ähnliche oder ihre Derivate ein. Solche Plasmide sind im Stand der Technik gut bekannt (Botstein et al., Miami Wntr. Symp. 19:265-274 (1982); Broach, In: „The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance“, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 445-470 (1981); Broach, Cell 28:203-204 (1982); Bollon et al., J. Clin. Hematol. Oncol. 10:39-48 (1980); Maniatis, In: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, pp. 563-608 (1980)).

[0077] Wenn der Vektor oder das Nukleinsäuremolekül, das das oder die Konstrukt(e) enthält, für die Expres-

sion hergestellt worden ist, kann/können das DNA-Konstrukt/die DNA-Konstrukte durch jedes einer Reihe von geeigneten Mitteln, d.h. Transformation, Transfektion, Konjugation, Protoplastenfusion, Elektroporation, Partikelkanonen-Technologie, Kalziumphosphat-Präzipitation, direkte Mikroinjektion und ähnliche, in eine entsprechende Wirtszelle eingeführt werden. Nach der Einführung des Vektors werden die Empfängerzellen in einem selektiven Medium, das für das Wachstum von vektor-enthaltenden Zellen selektiert, wachsen gelassen. Die Expression der klonierten Genmoleküle führt zu der Produktion von AUR-1 und/oder AUR-2 oder Fragmenten davon. Das kann in den transformierten Zellen als solche oder als Folge der Induktion dieser Zellen zur Differenzierung (zum Beispiel durch die Verabreichung von Bromdeoxyuracil an Neuroblastomazellen oder ähnliches) stattfinden. Eine Reihe von Inkubationsbedingungen kann verwendet werden, um die Peptide der vorliegenden Erfindung zu bilden. Die am meisten bevorzugten Bedingungen sind solche, die physiologische Bedingungen imitieren.

V. Gereinigte AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptide

[0078] Um die Peptide der vorliegenden Erfindung zu erhalten, kann eine Reihe von Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, verwendet werden. Die Peptide können aus Geweben oder Zellen, die das Peptid natürlich produzieren, gereinigt werden. Alternativ können die oben beschriebenen isolierten Nukleinsäurefragmente verwendet werden, um das AUR-1 und/oder AUR-2 Protein in jedem Organismus zu exprimieren. Die Proben der vorliegenden Erfindung schließen Zellen, Proteinextrakte oder Membranextrakte von Zellen oder biologische Flüssigkeiten ein. Die Probe kann basierend auf dem Assay-Format, dem Nachweisverfahren und der Natur des Gewebes, der Zellen oder der Extrakte, die als Probe verwendet werden, variieren.

[0079] Jeder eukaryotische Organismus kann solange als Quelle für das Peptid der Erfindung verwendet werden, wie der Quellenorganismus natürlicherweise solch ein Peptid enthält. Wie hierin verwendet bezieht sich „Quellenorganismus“ auf den ursprünglichen Organismus, aus dem die Aminosäuresequenz der Untereinheit abgeleitet ist, unabhängig von dem Organismus in dem die Untereinheit exprimiert und aus dem sie schließlich isoliert wird.

[0080] Der Durchschnittsfachmann kann einfach bekannte Verfahren zur Isolierung von Proteinen befolgen, um die Peptide frei von natürlichen Verunreinigungen zu erhalten. Diese schließen ein aber sind nicht begrenzt auf: Größenausschlusschromatographie, HPLC, Ionenaustauschchromatographie und Immunaффinitätschromatographie.

VI. Ein Antikörper, der Bindungsaffinität für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid besitzt und ein Hybridom, das den Antikörper enthält.

[0081] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Antikörper, der Bindungsaffinität für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid besitzt. Das Polypeptid kann die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:4 dargestellt ist oder von funktionalen Derivaten davon oder von mindestens 9 zusammenhängenden Aminosäuren davon (vorzugsweise mindestens 20, 30, 35 oder 40 zusammenhängende Aminosäuren davon) besitzen.

[0082] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf einen Antikörper, der eine spezifische Bindungsaffinität an ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid besitzt. Solch ein Antikörper kann durch den Vergleich der Bindungsaffinität für ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid mit seiner Bindungsaffinität für ein anderes Polypeptid isoliert werden. Solche, die selektiv an AUR-1 und/oder AUR-2 binden, würden für die Verwendung in Verfahren ausgewählt, die die Unterscheidung zwischen AUR-1 und/oder AUR-2 und anderen Polypeptiden erfordern. Solche Verfahren könnten einschließen aber sollten nicht begrenzt werden auf die Analyse von veränderter AUR-1 und/oder AUR-2 Expression in Geweben, die andere Polypeptide enthalten.

[0083] Die AUR-1 und/oder AUR-2 Proteine der vorliegenden Erfindung können in einer Reihe von Prozeduren und Verfahren, wie zum Beispiel für die Herstellung von Antikörpern, für die Verwendung in der Identifizierung von pharmazeutischen Zusammensetzungen und für die Untersuchung von DNA/Protein Interaktionen verwendet werden.

[0084] Das AUR-1 und/oder AUR-2 Peptid der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um Antikörper oder Hybridome zu erzeugen. Der Durchschnittsfachmann wird anerkennen, dass wenn ein Antikörper gewünscht ist, ein wie hierin beschriebenes Peptid erzeugt und als Immunogen verwendet werden würde. Die Antikörper der vorliegenden Erfindung schließen monoklonale und polyklonale Antikörper sowie Fragmente dieser Antikörper und humanisierte Formen davon ein. Humanisierte Formen der Antikörper der vorliegenden

Erfindung können unter Verwendung eines der Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, wie zum Beispiel Chimerisierung oder CDR-Übertragung erzeugt werden. Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf ein Hybridom, das den oben beschriebenen monoklonalen Antikörper oder bindende Fragmente davon produziert. Ein Hybridom ist eine immortalisierte Zelllinie, die in der Lage ist, einen spezifischen monoklonalen Antikörper zu sekretieren.

[0085] Im allgemeinen sind Techniken für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern und Hybridomen im Stand der Technik gut bekannt (Campbell, „Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, „Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984); St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35:1-21 (1980)). Jedes Tier (Maus, Kaninchen und ähnliche), das dafür bekannt ist Antikörper zu produzieren, kann mit dem ausgewählten Polypeptid immunisiert werden. Die Verfahren zur Immunisierung sind im Stand der Technik gut bekannt. Solche Verfahren schließen subkutane oder intraperitoneale Injektion des Polypeptids ein. Der Durchschnittsfachmann wird anerkennen, dass die Menge des Polypeptids, das für die Immunisierung verwendet wird, abhängig von dem Tier, das immunisiert wird, der Antigenität des Polypeptids und der Stelle der Injektion variieren wird.

[0086] Das Polypeptid kann modifiziert sein oder in einem Adjuvants verabreicht werden, um die Antigenität des Peptid zu erhöhen. Verfahren zur Erhöhung der Antigenität eines Polypeptids sind im Stand der Technik gut bekannt. Solche Verfahren schließen das Koppeln eines Antigens an ein heterologes Protein (wie zum Beispiel Globulin oder β -Galaktosidase) oder den Einschluss eines Adjuvants während der Immunisierung ein.

[0087] Für monoklonale Antikörper werden den immunisierten Tieren Milzzellen entnommen, mit Myelomzellen, wie zum Beispiel SP2/0-Ag14 Myelomzellen, fusioniert und ihnen auf diese Weise erlaubt zu monoklonale Antikörper produzierenden Hybridomzellen zu werden. Jedes einer Reihe von Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, kann verwendet werden um die Hybridomzellen zu identifizieren, die einen Antikörper mit den gewünschten Eigenschaften herstellen. Diese schließen das Screening der Hybridome mit einem ELISA Assay, eine Western Blot-Analyse oder einen Radioimmunoassay ein (Lutz et al., Exp. Cell Res. 175:109-124 (1988)). Hybridome, die die gewünschten Antikörper sekretieren, werden geklont und die Klasse und Subklasse wird unter Verwendung von Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, bestimmt (Campbell, „Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology“, supra (1984)).

[0088] Für polyklonale Antikörper werden Antisera, die Antikörper enthalten, aus den immunisierten Tieren isoliert und unter Verwendung eines der oben beschriebenen Verfahren auf die Anwesenheit von Antikörpern mit der gewünschten Spezifität gescreent. Die oben beschriebenen Antikörper können nachweisbar markiert werden. Antikörper können durch die Verwendung von Radioisotopen, Affinitätsmarkern (wie zum Beispiel Biotin, Avidin und ähnlichen), enzymatischen Markern (wie zum Beispiel Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase und ähnlichen), Fluoreszenzmarkern (wie zum Beispiel FITC oder Rhodamin und ähnlichen), paramagnetischen Atomen und ähnlichen markiert werden. Verfahren zum Erzielen einer solchen Markierung sind im Stand der Technik gut bekannt, siehe zum Beispiel (Stemberger et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315 (1970); Bayer et al., Meth. Enzym. 62:308 (1979); Engval et al., Immunot. 109:129 (1972); Goding, J. Immunol. Meth. 13:215(1976)). Die markierten Antikörper der vorliegenden Erfindung können für in vitro, in vivo und in situ Assays verwendet werden, um Zellen oder Gewebe, die ein spezifisches Peptid exprimieren, zu identifizieren.

[0089] Die oben beschriebenen Antikörper können ebenfalls auf einem festen Träger immobilisiert werden. Beispiele von solchen festen Trägern schließen Kunststoffe, wie zum Beispiel Polykarbonat, komplexe Kohlenhydrate wie zum Beispiel Agarose und Sepharose, Acrylharze, wie zum Beispiel Polyacrylamid und Latexkugeln ein. Techniken für das Koppeln von Antikörpern an solche festen Träger sind im Stand der Technik gut bekannt (Weir et al., „Handbook of Experimental Immunology“, 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10(1986); Jacoby et al., Meth. Enzym. 34, Academic Press, N.Y. (1974)). Die immobilisierten Antikörper der vorliegenden Erfindung können für in vitro, in vivo und in situ Assays sowie für die Immunchromatographie verwendet werden.

[0090] Des weiteren kann der Durchschnittsfachmann gegenwärtig erhältliche Verfahren sowie die Techniken, Verfahren und Kits die oben mit Bezug auf Antikörper offenbart werden einfach anpassen, um Peptide zu erzeugen, die in der Lage sind, an eine spezifische Peptidsequenz zu binden, um rational entworfene Antipeptidpeptide herzustellen, siehe zum Beispiel Hurby et al., „Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides“, In Synthetic Peptides, A User's Guide, W.H. Freeman, NY, pp. 289-307 (1992), and Kaspczak et al., Biochemistry 28:9230-8(1989).

[0091] Antipeptidpeptide können durch das Ersetzen der basischen Aminosäurereste, die in der AUR-1 und/oder AUR-2 Peptidsequenz gefunden werden mit sauren Resten erhalten werden, während hydrophobe und ungeladene polare Gruppen beibehalten werden. Zum Beispiel werden Lysin, Arginin und/oder Histidinreste mit Asparaginsäure oder Glutaminsäure ersetzt und Glutaminsäurereste werden durch Lysin, Arginin oder Histidin ersetzt.

VII. Ein Antikörper-basiertes Verfahren und ein Kit für den Nachweis von AUR-1 und/oder AUR-2

[0092] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Verfahren zum Nachweis eines AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptids in einer Probe, das umfasst: (a) Inkontaktbringen der Probe mit einem oben beschriebenen Antikörper unter Bedingungen, so dass sich Immunkomplexe bilden, und (b) Nachweis der Anwesenheit des an das Polypeptid gebundenen Antikörpers. Genauer umfassen die Verfahren die Inkubation einer Testprobe mit einem oder mehreren der Antikörper der vorliegenden Erfindung und dem Prüfen ob der Antikörper an die Testprobe bindet. Verglichen zu normalen Mengen veränderte Mengen von AUR-1 und/oder AUR-2 in einer Probe können eine Krankheit anzeigen.

[0093] Bedingungen für die Inkubation eines Antikörpers mit einer Testprobe variieren. Die Inkubationsbedingungen hängen von dem im Assay verwendeten Format, den verwendeten Nachweisverfahren und dem Typ und der Natur des Antikörpers, der in dem Assay verwendet wird, ab. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass jeder gewöhnlich erhältliche immunologische Assay (wie zum Beispiel Radioimmunoassay, Enzym-verbundener Immunsorbitions Assay, diffusionsbasierter Ouchterlony oder Rocket Immunofluoreszenzassay) einfach angepasst werden können, um die Antikörper der vorliegenden Erfindung zu verwenden. Beispiele von solchen Assays können in Chard, „An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques“ Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock et al., "Techniques in Immunocytochemistry", Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); und Tijssen, "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985) gefunden werden.

[0094] Die immunologischen Assay-Testproben der vorliegenden Erfindung schließen Zellen, Protein- oder Membranextrakte von Zellen oder biologische Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Blut, Serum, Plasma oder Urin ein. Die in dem oben beschriebenen Verfahren verwendete Testprobe kann basierend auf dem Assayformat, der Natur des Nachweisverfahrens und den Geweben, Zellen oder Extrakten, die als zu testende Probe verwendet werden, variieren. Verfahren für das Herstellen von Proteinextrakten oder Membranextrakten aus Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt und können einfach angepasst werden, um eine Probe zu erhalten, die für das verwendete System geeignet ist.

[0095] Ein Kit enthält alle notwendigen Reagenzien, um die zuvor beschriebenen Nachweisverfahren durchzuführen. Der Kit kann umfassen: (i) einen ersten Behälter, der einen oben beschriebenen Antikörper enthält, und (ii) einen zweiten Behälter, der ein Konjugat, das einen Bindungspartner des Antikörpers und einen Marker umfasst, enthält. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst der Kit ein oder mehrere andere Behälter, die eins oder mehrere der folgenden umfassen: Waschreagenzien und Reagenzien, die in der Lage sind, die Anwesenheit von gebundenen Antikörpern nachzuweisen.

[0096] Beispiele von Nachweisreagenzien schließen ein aber sind nicht begrenzt auf markierte Zweitantikörper oder als Alternative, wenn der Primärantikörper markiert ist, chromophore, enzymatische oder Antikörperbindungsreagenzien, die in der Lage sind mit dem markierten Antikörper zu reagieren. Ein kompartimentierter Kit kann wie oben für Nukleinsäuresondenkits beschrieben sein. Der Durchschnittsfachmann wird einfach erkennen, dass die Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, einfach in eines der bestehenden Kitformate, die im Stand der Technik gut bekannt sind, integriert werden können.

VIII. Isolierung von Verbindungen, die mit AUR-1 und/oder AUR-2 interagieren.

[0097] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf ein Verfahren zum Nachweis einer Verbindung, die in der Lage ist an ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid zu binden, und umfasst die Inkubation der Verbindung mit AUR-1 und/oder AUR-2 und den Nachweis der Anwesenheit der an AUR-1 und/oder AUR-2 gebundenen Verbindung. Die Verbindung kann in einer komplexen Mischung, zum Beispiel Serum, Körperflüssigkeiten oder Zellextrakten vorliegen.

[0098] Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf ein Verfahren, einen Agonisten oder Antagonisten der AUR-1 und/oder AUR-2 Aktivität oder der Aktivität eines AUR-1 und/oder AUR-2 Bindungspartners nach-

zuweisen, und umfasst die Inkubation von Zellen, die AUR-1 und/oder AUR-2 produzieren, in Gegenwart einer Verbindung und den Nachweis von Veränderungen in dem Level der Aktivität von AUR-1 und/oder AUR-2 oder einem AUR-1 und/oder AUR-2 Bindungspartner. Die so identifizierten Verbindungen würden eine Änderung der Aktivität erzeugen, die die Anwesenheit der Verbindung anzeigt. Die Verbindung kann in einer komplexen Mischung, zum Beispiel Serum, Körperflüssigkeit oder Zellextrakten vorliegen. Ist die Verbindung erst einmal identifiziert, kann sie unter Verwendung von Techniken, die im Stand der Technik gut bekannt sind, isoliert werden.

[0099] Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls ein Verfahren die in einem Säugetier mit AUR-1 und/oder AUR-2 verbundene Aktivität zu agonisieren (stimulieren) oder antagonisieren und umfasst das Verabreichen eines Agonisten oder Antagonisten für AUR-1 und/oder AUR-2 an besagtes Säugetier in einer ausreichenden Menge um besagten Agonismus oder Antagonismus auszuüben. Ein Verfahren zur Behandlung von Krankheiten in einem Säugetier mit einem Agonisten oder Antagonisten der mit AUR-1 und/oder AUR-2 verbundenen Aktivität, die das Verabreichen des Agonisten oder Antagonisten in einer ausreichenden Menge um AUR-1 und/oder AUR-2 assoziierten Funktionen zu agonisieren oder antagonisieren wird ebenfalls durch die vorliegende Anmeldung umfasst.

IX. Transgene Tiere.

[0100] Für das Erzeugen von transgenen Tieren, die mit dieser Erfindung verbunden sind, sind eine Reihe von Verfahren verfügbar. Vor der Fusion der männlichen und weiblichen Pronuklei kann DNA in den Pronukleus eines befruchteten Eis oder nach dem Start der Zellteilung in den Zellkern einer embryonischen Zelle (zum Beispiel dem Nukleus eines Zweizellembryos) injiziert werden (Brinster et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:4438-4442 (1985)). Embryos können mit Viren, insbesondere Retroviren, infiziert werden, die modifiziert wurden, um Nukleotidsequenzen für Rezeptoren für anorganische Ionen der vorliegenden Erfindung zu tragen.

[0101] Pluripotente Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse des Embryos abgeleitet sind und in Kultur stabilisiert wurden, können in Kultur manipuliert werden, um Nukleotidsequenzen der Erfindung einzuschließen. Durch Implantation in eine Blastozyste, die in eine Zielmutter implantiert wird und der erlaubt wird zu reifen, kann aus solchen Zellen ein transgenes Tier erzeugt werden. Tiere, die für transgene Experimente geeignet sind, können aus kommerziellen Standardquellen, wie zum Beispiel Charles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY), Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN), etc. erhalten werden.

[0102] Die Verfahren für die Manipulation des Nagetierembryos und für die Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus der Zygote sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt (Hogan et al., supra). Mikroinjektionsverfahren für Fische, Amphibieneier und Vögel werden in Houdebine und Chourrout, *Experientia* 47:897-905 (1991) genauer behandelt. Andere Verfahren für das Einbringen von DNA in Tiergewebe werden in US-Patent-Nr. 4,945,050 (Sandford et al., July 30, 1990) beschrieben.

[0103] Beispielsweise wird, um eine transgene Maus zu erzeugen, in weiblichen Mäusen die Bildung von Eizellen induziert. Die Weibchen werden mit Männchen zusammengesetzt und die befruchteten Weibchen werden durch CO₂-Erstickung oder Genickbruch getötet und aus den entnommenen Eileitern die Embryos gewonnen. Die umgebenden Kumuluszellen werden entfernt. Die pronukleären Embryos werden dann gewaschen und bis zur Zeit der Injektion gelagert. Zufällig wechselnde erwachsene weibliche Mäuse werden mit Männchen verpaart, die einer Vasektomie unterzogen wurden. Die Empfängerweibchen werden zu derselben Zeit wie die Donorweibchen verpaart. Die Embryos werden dann chirurgisch übertragen. Das Verfahren zum Erzeugen von transgenen Ratten ist zu dem von Mäusen identisch. Siehe Hammer et al., *Cell* 63:1099-1112 (1990).

[0104] Verfahren für das Kultivieren von embryonalen Stammzellen (ES) und die folgende Erzeugung von transgenen Tieren durch die Einfügung von DNA in ES-Zellen unter Verwendung von Verfahren, wie zum Beispiel Elektroporation, Kalziumphosphat/DNA-Präzipitation und direkte Injektion sind dem Durchschnittsfachmann ebenfalls gut bekannt. Siehe zum Beispiel *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed., IRL Press (1987).

[0105] In Fällen, die die zufällige Genintegration einschließen, wird ein Klon, der die Sequenz gemäß der Erfindung enthält mit einem Gen, das eine Resistenz kodiert, ko-transfiziert. Alternativ wird ein Gen, das für eine Neomycin-Resistenz kodiert, physikalisch an die Sequenz/den Sequenzen gemäß der Erfindung gebunden. Die Transfektion und Isolation der gewünschten Klone wird durch irgendeine der verschiedenen Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann gut bekannt sind, durchgeführt (E.J. Robertson, supra).

[0106] DNA-Moleküle, die in ES-Zellen eingeführt wurden, können ebenfalls durch den Prozess der homologen Rekombination in das Chromosom integriert werden. Capecchi, *Science* 244:1288-1292 (1989). Verfahren für die positive Selektion des Rekombinationsereignisses (d.h. Neo-Resistenz) und duale Positiv-Negativselektion (d.h. Neo-Resistenz und Gancyclovir-Resistenz) und die folgende Identifikation der gewünschten Klone durch PCR wurden durch Capecchi, *supra*, und Joyner et al., *Nature* 338: 153-156 (1989), deren Lehre hierin eingeschlossen ist, beschrieben. Die Schlussphase des Verfahrens ist es, die Ziel-ES-Zellen in Blastozysten zu injizieren und die Blastozysten in pseudoschwangere Weibchen zu überführen. Die resultierenden chimären Tiere werden gezüchtet und die Nachkommen durch Southern Blotting analysiert, um Individuen zu identifizieren, die das Transgen tragen. Verfahren für die Erzeugung von Nicht-Nagetier-Säugetieren und anderen Tieren wurden von anderen diskutiert. Siehe Houdebine and Chourrot, *supra*; Pursel et al., *Science* 244:1281-1288 (1989); and Simms et al., *Bio/Technology* 6:179-183 (1988).

[0107] Somit stellt die Erfindung transgene, nicht-menschliche Säugetiere bereit, die ein Transgen, das ein AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kodiert, oder ein Gen, das die Expression von einem AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid bewirkt, enthalten. Solche transgenen, nicht-menschlichen Säugetiere sind insbesondere als ein in vivo Testsystem zum Studieren der Wirkung der Einführung eines AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptids, der Regulation der Expression von einem AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid (d.h. durch die Einführung von zusätzlichen Genen, Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozymen) nützlich.

[0108] Ein „transgenes Tier“ ist ein Tier, das Zellen besitzt, die DNA enthalten, die künstlich in eine Zelle eingefügt worden ist, wobei die DNA Teil des Genoms des Tieres wird, das sich aus dieser Zelle entwickelt. Bevorzugte transgene Tiere sind Primaten, Mäuse, Ratten, Kühe, Schweine, Pferde, Ziegen, Schafe, Hunde und Katzen. Die transgene DNA kann für ein menschliches AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid kodieren. Die native Expression in einem Tier kann durch das Bereitstellen einer Menge von Antisense-RNA oder DNA, die wirksam ist die Expression des Rezeptors zu reduzieren, verringert werden.

X. Gentherapie

[0109] AUR-1 und/AUR-2 oder ihre genetischen Sequenzen werden ebenfalls in der Gentherapie nützlich sein (behandelt in Miller, *Nature* 357:455-460, (1992)). Miller stellt fest, dass Fortschritte zu praktischen Ansätzen in der menschlichen Gentherapie geführt haben, die erste positive Ergebnisse gezeigt haben. Die Grundlagen der Gentherapie werden in Mulligan, *Science* 260:926-931, (1993) beschrieben.

[0110] In einer bevorzugten Ausführungsform, wird ein Expressionsvektor, der eine AUR-1 und/oder AUR-2 kodierende Sequenz enthält in Zellen eingeführt, die Zellen werden in vitro wachsen gelassen und dann in großen Zahlen in Patienten infundiert. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein DNA-Segment, das den gewünschten Promoter enthält (zum Beispiel einen starken Promoter) in Zellen überführt, die ein endogenes AUR-1 und/oder AUR-2 enthalten, und zwar in so einer Art und Weise, dass das Promotersegment die Expression des endogenen AUR-1 und/oder AUR-2 Gens verstärkt (zum Beispiel wird das Promotersegment so in die Zelle überführt, das es direkt mit dem endogenen AUR-1 und/oder AUR-2 Gen verbunden wird).

[0111] Die Gentherapie kann die Verwendung eines Adenovirus, das AUR-1 und/oder AUR-2 cDNA enthält, und auf einen Tumor gerichtet ist, eine systemische AUR-1 und/oder AUR-2 Erhöhung durch die Implantation von erzeugten Zellen, Injektion mit einem AUR-1 und/oder AUR-2 Virus oder Injektion von nackter AUR-1 und/oder AUR-2 DNA in geeignete Gewebe einschließen.

[0112] Die Zielzellpopulationen können durch das Einführen von verschiedenen Formen von einem oder mehreren Bestandteilen der Proteinkomplexe modifiziert werden, um die Aktivität von solchen Komplexen zu modulieren. Um zum Beispiel die Aktivität eines Komplexbestandteils in Zielzellen zu reduzieren oder inhibieren kann ein abnormales Signaltransduktionsereignis, das zu einer Krankheit führt, verringert, gehemmt oder umgekehrt werden. Selektions- oder Missense-Mutanten eines Bestandteils, der die Fähigkeit mit anderen Bestandteilen der Proteinkomplexe zu interagieren beibehält, aber nicht in der Signaltransduktion funktionieren kann, können verwendet werden um ein abnormales, schädliches Signaltransduktionsereignis zu hemmen.

[0113] Von Viren, wie zum Beispiel Retroviren, Vaccinia-Viren, Adenoviren, Adeno-verbundenen Viren, Herpesviren, verschiedene RNA-Viren oder bovinen Papilloma-Viren, abgeleitete Expressionsvektoren können für die Abgabe von Nukleotidsequenzen (zum Beispiel cDNA), die rekombinantes AUR-1 und/oder AUR-2 Protein kodieren, in die Zielzellpopulation (zum Beispiel Tumorzellen) verwendet werden. Um rekombinante virale Vektoren zu erzeugen, die kodierende Sequenzen enthalten, können Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann gut bekannt sind, verwendet werden. Siehe zum Beispiel die Techniken, die in Maniatis et al., *Molecular Clo-*

ning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989), und in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) beschrieben sind. Alternativ können rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die Proteinsequenzen kodieren, als nackte DNA oder in einem rekonstituierten System zum Beispiel in Liposomen oder anderen Lipidsystemen für die Abgabe an Zielzellen verwendet werden (siehe zum Beispiel Felgner et al., Nature 337:387-8, 1989). Für die Verwendung in der menschlichen Gentherapie gibt es verschiedene weitere Verfahren für den direkten Transfer von Plasmid-DNA in Zellen und schließen durch das Komplexieren der Plasmid-DNA an Proteine das Targeting der DNA auf Zellrezeptoren ein. Siehe Miller, supra.

[0114] In seiner einfachsten Form kann der Gentransfer einfach durch das Injizieren von winzigen Mengen von DNA in den Zellkern einer Zelle durch das Verfahren der Mikroinjektion durchgeführt werden. Capecchi MR, Cell 22:479-88 (1980). Sind rekombinante Gene erst einmal in eine Zelle eingeführt, können sie durch die normalen Zellmechanismen für Transkription und Translation erkannt werden und ein Genprodukt wird exprimiert. Zum Einbringen von DNA in eine größere Anzahl von Zellen wurden ebenfalls andere Methoden getestet. Diese Methoden schließen ein: Transfektion, wobei die DNA mit CaPO_4 präzipitiert und durch Pinocytose in Zellen aufgenommen wird (Chen C. and Okayama H, Mol. Cell Biol. 7:2745-52 (1987)); Elektroporation, wobei Zellen großen Spannungsimpulsen ausgesetzt werden, um Löcher in der Membran zu erzeugen (Chu G. et al., Nucleic Acids Res., 15:1311-26 (1987)); Lipofektion/Liposomfusion, wobei die DNA in lipophile Vesikel gepackt wird, die mit einer Zielzelle fusionieren (Felgner PL., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413-7 (1987)); und Partikelbeschuss, unter Verwendung von DNA, die an kleine Projektile gebunden ist (Yang NS. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9568-72 (1990)). Ein anderes Verfahren für das Einführen von DNA in Zellen ist es, die DNA an chemisch modifizierte Proteine zu koppeln.

[0115] Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Adenovirusproteine in der Lage sind, Endosomen zu destabilisieren und die Aufnahme von DNA in Zellen zu erhöhen. Die Beimischung von Adenoviren zu Lösungen, die DNA-Komplexe enthalten, oder das Binden von DNA an Polylysin, das kovalent an ein Adenovirus gebunden ist, unter Verwendung von Proteinkreuzvernetzungsmitteln, verbessert die Aufnahme und Expression des rekombinanten Gens wesentlich. Curiel DT et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 6:247-52 (1992).

[0116] Wie hierin verwendet meint "Gentransfer" den Prozess des Einführens eines fremden Nukleinsäuremoleküls in eine Zelle. Gentransfer wird üblicherweise durchgeführt, um die Expression eines bestimmten Produktes, das von dem Gen kodiert wird, zu ermöglichen. Das Produkt kann ein Protein, Polypeptid, Antisense-DNA oder RNA oder enzymatisch aktive RNA einschließen. Gentransfer kann mit kultivierten Zellen oder durch die direkte Verabreichung an Tiere durchgeführt werden. Im Allgemeinen schließt der Gentransfer den Prozess des Inkontaktbringens einer Nukleinsäure mit einer Zielzelle durch unspezifische oder Rezeptor-vermittelte Interaktionen, Aufnahme der Nukleinsäure in die Zelle durch die Membran oder durch Endozytose und Freisetzung der Nukleinsäure aus der Plasmamembran oder dem Endosom in das Cytoplasma ein. Die Expression kann zusätzlich den Transport der Nukleinsäure in den Zellkern der Zelle und die Bindung an geeignete nukleäre Faktoren für die Transkription erfordern.

[0117] Wie hierin verwendet ist „Gentherapie“ eine Form des Gentransfers und ist in der Definition des Gentransfers wie hierin verwendet eingeschlossen und bezieht sich speziell auf einen Gentransfer, um ein therapeutisches Produkt aus einer Zelle in vivo oder in vitro zu exprimieren. Der Gentransfer kann ex vivo auf Zellen angewandt werden, die dann in einen Patient transplantiert werden oder kann durch die direkte Verabreichung der Nukleinsäure oder eines Nukleinsäure-Proteinkomplexes in den Patienten durchgeführt werden.

[0118] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein Vektor bereitgestellt, der eine Nukleinsäuresequenz besitzt, die AUR-1 und/oder AUR-2 kodiert, wobei die Nukleinsäuresequenz nur in bestimmtem Gewebe exprimiert wird. Verfahren zum Erreichen von gewebespezifischer Genexpression werden in der internationalen Veröffentlichung Nr. WO 93/09236, eingereicht am 03. November 1992 und veröffentlicht am 13. Mai 1993 dargelegt.

[0119] In allen vorangehenden oben beschriebenen Vektoren ist ein weiterer Aspekt der Erfindung, dass die Nukleinsäuresequenz, die in dem Vektor enthalten ist, Additionen, Deletionen oder Modifikationen eines Teils oder der gesamten Sequenz der Nukleinsäure, wie oben beschrieben, einschließen kann.

[0120] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform, wird ein Verfahren des Genersatzes beschrieben. „Genersatz“ wie hierin verwendet meint das Bereitstellen einer Nukleinsäuresequenz, die in der Lage ist in vivo in einem Tier exprimiert zu werden und dadurch die Funktion eines endogenen Gens, das in dem Tier fehlt oder defekt ist, bereitzustellen oder zu verstärken.

Beispiele

[0121] Die unten stehenden Beispiele sind nicht begrenzend und sind für verschiedene Aspekte und Merkmale der vorliegenden Erfindung nur veranschaulichend. Die unten stehenden Beispiele zeigen die Isolierung und Charakterisierung der neuartigen Proteine AUR-1 und AUR-2.

[0122] Proteinkinasen sind eine der größten Familien von eukaryotischen Proteinen mit mehreren hundert bekannten Mitgliedern. Diese Proteine teilen eine 250-300 Aminosäure lange Domäne, die in 12 verschiedene Subdomänen unterteilt werden kann, die die gemeinsame katalytische Kernstruktur umfassen. Diese konservierten Proteinmotive wurden kürzlich unter Verwendung von PCR-basierten Klonierungsstrategien verwendet, was zu einer deutlichen Erweiterung der bekannten Kinasen führte. Das vielfache Alignment der Sequenzen in der katalytischen Domäne von Proteinkinasen und folgende phylogenetische Analysen erlauben ihre Auftrennung in einem phylogenetischen Baum. Auf diese Art und Weise werden verwandte Kinasen in unterschiedlichen Zweigen oder Unterfamilien gebündelt und schließen ein: Tyrosinkinasen, zyklische Nukleotid-abhängige Kinasen, Calcium/Calmodulinkinasen, Cyclin-abhängige Kinasen und MAP-Kinasen, sowie verschiedene andere weniger gut definierte Unterfamilien.

[0123] Anfänglich begannen wir, um Homologe von CCK4, einem Rezeptor, der eine bestimmte Familie von Tyrosinkinasen dargestellt, zu identifizieren. Vielfältige Alignments ließen vermuten, das CCK4 am nächsten mit ROS und der TRK-Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen verwandt war. Wir entwarfen degenerierte Primer für konservierte Sequenzen innerhalb der Kinase Subdomänen I und IX dieser Rezeptoren. Unterdomäne I liegt am N-Terminus der Kinasedomäne und enthält das Konsensusmotiv GXGXXGXV, das bei der Verankerung von ATP in der katalytischen Einheit aller Klassen von Kinasen beteiligt ist. Unterdomäne IX enthält ein nahezu invariables Asp, das dazu dient, die katalytische Schleife durch die Bindung an Reste in Unterdomäne VIB zu stabilisieren. Dieses invariante Asp und die flankierenden Aminosäuren werden oft in PCR-Klonierungsstrategien verwendet, da sie Tyrosinkinasen (DVWSY/FGI/V) von Serin/Threoninkinasen (DXWA/SXGI/V) unterscheiden. Basierend auf dem Vergleich von allen bekannten Proteinkinasen, entwarfen wir degenerierte Oligonukleotidprimer für die Unterdomänen I und IX, die mittels PCR nur CCK4 und sein Huhn-Homolog KLG erfassen würden.

[0124] Wir entwickelten die degenerierten Primer A und DVW basierend auf konservierten Resten innerhalb der Kinasedomäne von CCK4 für die Verwendung bei der Identifikation von neuen Kinasen mittels Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR). Wenn sie auf HEPM Zell-sscDNA als Vorlage angewandt wurden, wurden viele Kopien von CCK4 sowie ein neues DNA-Fragment (43-43) von 567 Basenpaaren mit Homologie zu anderen Kinasen isoliert. Die neue Sequenz war Drosophila Aurora Kinase (GeneBank Accession #X83465) am ähnlichsten und der Klon wurde als menschliches Aurora1 bezeichnet. Unter Verwendung dieses Fragmentes als Sonde, testeten wir RNAs von einer Reihe von Darmkrebszelllinien und einem Northern Blot von vielen menschlichen Geweben, und zeigten eine offensichtliche Selektivität der Expression von Aurora1 in Tumorzellen. Die Aurora1 Sonde wurde ebenfalls verwendet um eine cDNA-Bibliothek, die aus einer menschlichen Bauchspeicheldrüsenkrebszelllinie mRNA hergestellt wurde, zu screenen und überlappende Klone zu isolieren, die den vollständigen offenen Leserahmen von Aurora1 abdecken. Von den vielen isolierten Klonen entsprachen sieben menschlichem Aurora1. Zwei zusätzliche schwach hybridisierende Klone wurden während diesem Screen ebenfalls isoliert und die Sequenzanalyse offenbarte, dass sie einer verwandten, aber unterscheidbaren Kinase entsprechen, die wir als menschliches Aurora2 bezeichneten.

[0125] Rekombinantes Aurora1 und Aurora2, exprimiert in COS-Zellen, wanderten mit einem offensichtlichen Mr von 39.000 und 46.000, was im Einklang mit ihren basierend auf ihrer Primäraminosäuresequenz vorhergesagten Molekulargewichten von 39264 und 46730 in Einklang ist. Diese Analyse bestätigte, dass das rekombinante Protein stabil in Säugetierzellen produziert werden kann. Phosphorylierungsassays, um die Targetspezifität dieser vermeintlichen Kinasen zu bestimmen laufen zur Zeit.

[0126] Spezifische Immunreagenzien gegen Peptidsequenzen aus den N-terminalen Domänen von AUR1 und AUR2 wurden in Kaninchen erzeugt und diese Reagenzien verwendet, um die Expression von endogenen und rekombinanten Auroras in den Zellen zu lokalisieren. Des Weiteren können diese Reagenzien in den Bemühungen Substrate für die Auroras zu identifizieren, um ihre normale biologische Rolle besser zu verstehen, verwendet werden.

[0127] Dominant negative und konstitutiv aktive Formen von AUR-1 und AUR-2 sind nützlich, um die biologischen Konsequenzen von entweder dem Fehlen oder der Überexpression dieser vermeintlicher Serin/Threoninkinasen zu bestimmen. Erste Studien mit veränderten DNA-Konstrukten zeigen, dass als Folge der Infekti-

on von NIH3T3 oder BALB/3T3 Zellen mit AUR1 oder AUR2 retroviralen Stämmen in nur 2 Stunden die Zellen multinukleär werden. Dieser Phänotyp wurde beibehalten, so dass 2 Tage nach der Infektion einige Zellen gefunden wurden, die bis zu 20 Nuklei besaßen. Die multinukleären Zellen hatten typischerweise ein vergrößertes Zytoplasma und diffuse Zellgrenzen. Immunfärbung sowohl mit Actin als auch DAPI bestätigte, dass diese Nuklei alle in einer einzigen Zelle enthalten waren und dass das Actin-Cytoskelett anscheinend normal war. Laufende Experimente richten sich auf den Chromosomengehalt und die Intaktheit innerhalb der Nuklei, die Anzahl und der Ort der Centrosomen und die allgemeine Organisation des Mikrotubulinnetzwerkes.

[0128] Die Charakterisierung der Langzeitfolgen der Expression von AUR-1 oder AUR-2 normal, konstitutiv aktiv und dominant negativ laufen und richten sich insbesondere darauf, ob sie die zelluläre Transformation induzieren oder umkehren. Es werden stabile Klone isoliert, die diese rekombinanten Proteine exprimieren. Sie werden hinsichtlich der Wachstumsrate, DNA-Synthese, Zell-Kontakt-Inhibition (Foci Formation), verankerungsunabhängiges Wachstum (Soft Agar Assays) und Tumorigenität in Nacktmäusen charakterisiert.

[0129] Welche Rolle spielen die Auroras Replikation und Trennung von Centrosomen in Säugetieren? Es ist bekannt, dass die Unterbrechung oder die Deregulation solcher Funktionen in Hefe, Drosophila und Amphibien zu falscher Chromosomentrennung, monopolen Spindeln und asymmetrischer Kernteilung führt. Die Homologie zwischen menschlichen Auroras und dem Hefe IPL1 und Drosophila Aurora ist bemerkenswert. Daher möchten wir bestimmen, ob die menschlichen Auroras funktionelle Äquivalente des Hefe IPL1 sind. Das Hefe IPL1 Gen ist für die sehr genaue Chromosomentrennung in *Saccharomyces cerevisiae* verantwortlich (Francisco, L., et al., Mol. Cell. Biol. 14:4731-4740, 1994) und es wurde eine temperatursensitive Mutante isoliert. Wir planen zu bestimmen, ob verschiedene Vollängen und chimäre Versionen der menschlichen Auroras diese temperatursensitive Mutante in Hefe komplementieren können. Die chimären Konstrukte, die die N-terminale Domäne von IPL1 und die Kinasedomäne von den menschlichen Auroras enthalten, erlauben uns zu bestimmen, ob die Kinase funktionell äquivalent ist, während die potentielle regulatorische Rolle oder die Rolle der intrazellulären Lokalisation, die durch die weniger konservierten N-terminalen Domänen vermittelt werden, vermieden werden. Sollten die menschlichen Gene den IPL1 Funktionsverlust kompensieren, könnten wir eine solche Linie dann verwenden, um nach niedermolekularen Inhibitoren der menschlichen Aurora Kinase zu screenen.

Beispiel 1: Molekulares Klonieren

[0130] Gesamt-RNAs wurden unter Verwendung des Guanidin-Salz/Phenol Extraktionsprotokolls von Chomczynski und Sacchi (P. Chomczynski und N. Sacchi, Anal. Biochem. 162, 156 (1987) aus normaler/normalem/normalen menschlicher/menschlichem/menschlichen Prostata, Duodenum, Eierstöcken, Leber, Hypophyse, Gehirn, Thymus und Speicheldrüse, aus menschlichen HEPM-Zellen (palatales Mesenchym), aus einem primären menschlichen Wilm's Tumor und Eierstockkarzinom und aus menschlichen Tumorzelllinien, die aus dem Colon/Rectum (HT29, SW480, SW1463, SW1417, SW837, SW948, SW620, SW403, SW1116, T84, HTC15, LS123, und Caco-2), Niere (CaKi-1, CaKi-2), Leber (SK-HEP-1), Pankreas (HS766T, ASPSC, Capan-1) und Brust (MCF7) stammen, isoliert.

[0131] Diese RNAs wurden als Matrizen verwendet, um einzelsträngige cDNAs unter Verwendung des Superscript Präamplifikationssystems für die Erststrangsynthese-Kits, das von GibcoBRL (Life Technologies, U.S.A.; Gerard, GF et al. (1989), FOCUS 11, 66) erworben wurde, unter den Bedingungen, die vom Hersteller empfohlen werden, herzustellen. Eine typische Reaktion verwendet 10 µg Gesamt-RNA oder 2 µg Poly(A)⁺RNA mit 1,5 µg Oligo(dt)₁₂₋₁₈ in einem Reaktionsvolumen von 60 µl. Das Produkt wurde mit RNaseH behandelt und mit H₂O auf 100 µl verdünnt. Für die folgende PCR-Amplifikation wurden 1-4 µl dieser sscDNAs in jeder Reaktion verwendet.

[0132] Oligonukleotide wurden in einem Applied Biosystems 394 DNA Synthetisierer unter Verwendung bekannter Phosphoramiditchemie synthetisiert und wurden nach der Präzipitation mit Ethanol ungereinigt verwendet. Die degenerierten Oligonukleotidprimer sind: A = 5'-GARTTYGGNGARGTNTTTYTNGC-3' (SEQ ID NO:16) (Sense) und DVW = AGNACNCCRAANGCCCACACRTC-3' (SEQ ID NO:17) (Antisense).

[0133] Diese Primer wurden von den Peptidsequenzen EFGEVFLA (SEQ ID NO:18) (Sense Strang der Kinase Subdomäne I) und DVW(A/S)FGVL (Antisense-Strang der Kinase Subdomäne IX) abgeleitet. Die Bezeichnungen der Reste von degenerierten Nukleotiden sind: N = A, C, G oder T; R = A oder G; und Y = C oder T. Unter Verwendung von CCK4 als Matrize erzeugten diese Primer ein Produkt von 567 Basenpaaren.

[0134] Unter Verwendung der Primer A und DVW wurde eine PCR-Reaktion mit den Einzelstrangquellen, die

oben aufgelistet sind, durchgeführt. Die Primer wurden mit einer Endkonzentration von jeweils 5 µM zu einer Mischung, die 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM von jedem Deoxynukleosid Triphosphat, 0,001 Gelatine und 1,5 U AmpliTaq DNA-Polymerase (Perkin-Elmer/Cetus) und 1-4 µl cDNA enthielt, zugegeben. Nach 3 Minuten Denaturierung bei 95°C waren die Zyklusbedingungen 94°C für 30 Sekunden, 37°C für 1 Minute, ein 2-Minuten-Anstieg auf 72°C und 72°C für 1 Minute für die ersten drei Zyklen, gefolgt von 94°C für 30 Sekunden, 50°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute 45 Sekunden für 35 Zyklen. PCR-Fragmente, die zwischen 500-600 Basenpaaren wandern, wurden unter Verwendung von GeneClean (Bio101) aus 2% Agarosegelen isoliert und gemäß dem Herstellerprotokoll T-A in den pCRII-Vektor (Invitrogen Corp. U.S.A.) kloniert.

[0135] Für die Miniplasmid-DNA-Herstellung unter Verwendung von Qiagen-Säulen wurden Kolonien ausgewählt und die Plasmid-DNAs unter Verwendung eines Cycle Sequencing Dye-Terminator Kit mit AmpliTaq DNA-Polymerase FS (ABI, Foster City, CA) sequenziert. Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden auf einem ABI Prism 377 DNA-Sequenzierer laufen gelassen und unter Verwendung des BLAST Alignment Algorithmus (Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-10) analysiert. Über PCR mit den Primern A und DVW und Einzelstrang-cDNA aus menschlichem, embryonalem, palatalem Mesenchym (HEPM oder CRL1486) als Matrize wurde ein neuer Klon (#43-43) isoliert. Dieser Klon wurde im Folgenden als Fragment von menschlichem Aurora1 bezeichnet.

[0136] Eine Lambda ZapII (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung von mRNA aus einem Pool von Pankreaskarzinom-Zelllinien als Matrize für die Erststrang-cDNA-Synthese erzeugt. Die Phagen wurden auf Nitrocellulose-Filtern mit dem zufällig präparierten ³²P markiertem Insert aus p43-43, das menschliches Aurora1 kodiert, bei 2 × 10⁶ cpm/ml in Hybridisierungspuffer, der 6xSSC, 1x Denhardt's Reagenz, 0,1% SDS mit 0,1 mg/ml denaturierter, fragmentierter Lachssperma-DNA, gescreent. Nach über Nacht Hybridisierung bei 65°C, wurden die Filter bei 65°C in 0,1 × SSC, 0,1% SDS gewaschen. Beide Stränge der Vollängen-cDNA-Klone wurden unter Verwendung manueller Sequenzierung mit T7 Polymerase und Oligonukleotidprimern (Tabor and Richardson, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:4767-71) sequenziert.

Beispiel 2: Northern Blot Analyse

[0137] Northern Blots, die pro Spur 2 µg Poly A+RNA von 16 unterschiedlichen adulten menschlichen Geweben (Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Eierstock, Dünndarm, Darmschleimhaut, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas und periphere Blutleukozyten), vier unterschiedlichen menschlichen fötalen Geweben (Gehirn, Lunge, Leber und Niere) und 8 menschlichen Krebszelllinien (HL60, HeLa, K-562, MOLT-4, Raji, SW480, und G361) auf einer ladungsmodifizierten Nylonmembran enthielten, wurden von Clontech (Palo Alto, CA) erhalten. Zusätzliche Northern Blots wurden durch das Laufen lassen von 10 µg Gesamt-RNA, die aus menschlichen Tumorzelllinien isoliert wurde, auf einem denaturierenden Formaldehyd 1,2% Agarosegel und das Übertragen auf Nylonmembranen hergestellt.

[0138] Die Filter wurden mit zufällig präparierten [³²P]dCTP-markierten Sonden hybridisiert, die entweder aus dem 527 bp Insert des menschlichen Aurora1 Klons 43-43 oder dem 1162 bp EcoRI-Fragment von pSG20 und entweder dem 1kb EcoRI-Fragment des menschlichen Aurora2 Klons 11-1A oder dem 1257 bp BamHI-Not I Fragment von pS621 synthetisiert wurden. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 60°C in 6XSSC, 0,1% SDS; 1X Denhardt's Lösung, 100 mg/ml denaturierter Heringssperma-DNA mit 1-2 × 10⁶ cpm/ml ³²P-markierten DNA-Sonden durchgeführt. Die Filter wurden in 0,1XSSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen und über Nacht einem Kodak XAR-2 Film ausgesetzt.

[0139] Ein einzelnes AUR1 mRNA Transkript von ungefähr 1,4kb wurde identifiziert und es wurde gefunden, dass es in Thymus und Dünndarm reichlich vorhanden ist, mit schwachen Signalen in Hoden, Eierstöcken, Dickdarm, Plazenta und Milz. Prostata und periphere Blutlymphozyten waren negativ. Menschliche fötale Leber und Niere waren ebenfalls positiv mit einem schwächeren Signal in fötaler Lunge und keiner Expression in fötalem Gehirn (Tabelle).

[0140] Eine ähnliche Analyse der Expression von menschlichem AUR2 zeigte ein stärker begrenztes Expressionsprofil. Ein einzelnes 2,4 kb AUR2 Transkript wurde stark in adultem Hoden und Thymus und schwach in Herz, Plazenta, Skelettmuskeln und in fötaler Leber und Niere nachgewiesen, während die anderen normalen Gewebequellen negativ waren (siehe Tabelle).

AURORA 1 und AURORA 2 Northern Analyse in menschlichem Normalgewebe und Krebszellen

Zellart	Ursprung	AUR 1	AUR 2
Thymus	Normales Gewebe	5	4
Fötale Leber	Normales Gewebe	4	2
Fötale Niere	Normales Gewebe	4	1
Lunge	Normales Gewebe	3	0
Duodenum	Normales Gewebe	2	1
Colon	Normales Gewebe	2	0
Fötale Lunge	Normales Gewebe	2	0
Ovarien	Normales Gewebe	2	0
Testis	Normales Gewebe	2	2
Gehirn	Normales Gewebe	0	0
Cerebellum	Normales Gewebe	0	0
Speicheldrüse	Normales Gewebe	0	0
Herz	Normales Gewebe	0	0
Leber	Normales Gewebe	0	0
Pankreas	Normales Gewebe	0	0

Niere	Normales Gewebe	0	0
Milz	Normales Gewebe	0	0
Magen	Normales Gewebe	0	0
Uterus	Normales Gewebe	0	0
Prostata	Normales Gewebe	0	0
Skelettmuskel	Normales Gewebe	0	0
Fötales Gehirn	Normales Gewebe	0	0
PBLs	Normales Gewebe	0	0
Speicheldrüse	Normales Gewebe	0	0
Plazenta	Normales Gewebe	0	0
SF-268	ZNS-Tumor	4	ND
CCRF-CEM	Leukämie	4	ND
K-562	Leukämie	4	ND
HCC-2998	Darmtumor	4	ND
SW620	Darmtumor	4	2
KM-12	Leukämie	4	ND
MCF7/ADR-RES	Brusttumor	4	2
MDA-N	Brusttumor	4	ND
BT-549	Brusttumor	4	ND
SW480	Darmtumor	4	4
SW48	Darmtumor	4	ND
Calu-3	Lungentumor	4	ND
Calu3	Lungentumor	4	2
T47D	Brusttumor	4	2
A375	Melanom	4	0
SF767	ZNS-Tumor	4	0
SW1417	Darmtumor	4	4
CaKi2	Nierentumor	4	0
CaKi1	Nierentumor	4	0
Caco2	Darmtumor	4	4
SW1417	Darmtumor	4	0

T98G	ZNS-Tumor	4	0
SF-539	ZNS-Tumor	3	ND
SK-MEL-2	Melanom	3	ND
SK-MEL-5	Melanom	3	ND
R-48	Magentumor	3	ND
RF-1	Magentumor	3	ND
SW948	Darmtumor	3	ND
AGS	Magentumor	3	ND
HFL1	Normale Lunge	3	ND
OVCAR-8	Eierstocktumor	2	ND
HT-29	Darmtumor	2	ND
MDA-MB-231	Brusttumor	2	ND
MDA-MB-435	Brusttumor	2	ND
SK-MEL-5	Melanom	2	ND
Kato-3	Magentumor	2	ND
Colo 205	Darmtumor	2	ND
Colo 320DM	Darmtumor	2	2
WiDr	Darmtumor	2	ND
HT-29	Darmtumor	2	ND
SNU-C2B	Darmtumor	2	ND
HTC15	Darmtumor	2	2
T84	Darmtumor	2	0
SW948	Darmtumor	2	0
Daoy	ZNS-Tumor	2	0
OVCAR3	Eierstocktumor	2	0
HS766T	Pankreastumor	2	0
SW1116	Darmtumor	2	0
Wilms Tumor	Nierentumor	2	0
UO-31	Nierentumor	0	ND

[0141] Das AUR1 mRNA Expressionsprofil in verschiedenen Primärtumoren und mehreren Zelllinien von verschiedenem neoplastischem Ursprung wurde über Northern Analyse und durch den semi-quantitativen PCR-Assay, unter Verwendung von Primern von Sequenzen in der AUR1 Kinasedomäne, bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle eingeschlossen. AUR1 Transkripte wurden in jeder untersuchten Tumorklinie bestimmt, mit der höchsten Expression in verschiedenen menschlichen Darmkrebszelllinien (SW480, Colo320, SW620, SW1417, Caco2, SW12417) und in Lungenkarzinom (Calu3), Brustkarzinom (T47D, MCF7), Melanom (A375), Nierenkarzinom (CaKi-1, CaKi-2), Leberkarzinom (SK-HEP-1) und neuralen Tumoren (SF767, T98G). Niedrigere Expression von AUR1 wurde in anderen Darmkarzinomen (HTC15, T84, SW948, SW1116, HT29), neuralen Tumoren (Daoy), Ovarialkarzinomen (Ovar3, Primärtumor), Pankreaskarzinom (HS766T) und ei-

nem primären Nierentumor gefunden.

[0142] Das AUR2 Expressionsprofil in Tumorzelllinien war erstaunlicherweise stärker begrenzt als das von AUR1. Eine starke Expression von AUR1 wurde nur in Darmkarzinomzelllinien (Caco2, SW480, SW1417, SW620) entdeckt, während schwache Signale in anderen Darm- (HTC15, Colo320), Brust- (T47D, MCF7) und Lungen- (Calu3) Tumorzelllinien gefunden wurden. Verschiedene andere Tumorzelllinien besaßen keine nachweisbaren AUR2 Transkripte.

Beispiel 3: Semi-quantitative PCR-Bestimmung von AURORA1

[0143] RNA wurde aus einer Vielzahl menschlicher Zelllinien, frischen gefrorenen Geweben und Primärtumoren isoliert. Aus 10 mg jeder RNA wurden wie oben beschrieben unter Verwendung des Superscript Präamplifikationssystems (GibcoBRL) Einzelstrang cDNA synthetisiert. Diese Einzelstrang Matrizen wurden dann in einer 35 Zyklus PCR-Reaktion mit zwei AURORA1-spezifischen Oligonukleotiden (3476:5'-TTTGGCTCGG-GAGAAGAAAAGCCAT-3' (SEQ ID NO:19) und 3506:5'-CAATCATCTCTGGGGGCAGGTAGT-3') (SEQ ID NO:20) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden auf 2%-igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt, mit Ethidium Bromid gefärbt und auf einer UV-Lichtbox photographiert. Die relative Intensität der ~ 475-bp AURORA1-spezifischen Banden wurde für jede Probe geschätzt.

Beispiel 4: Southern Blot Analyse

[0144] Genomische DNA wurde aus einer Reihe von transformierten menschlichen Zelllinien (CaCO2, HTC15, LS147T, SKCO4, SW480, sW403, SW620, SW948, SW1417, SW1116, MCF7, BT474) unter Verwendung von Standardverfahren (Maniatis et al.) isoliert. Die Zellen wurden trypsinisiert und mit 10^8 Zellen/ml in Verdauungspuffer (100mM NaCl, 10mM Tris pH8, 25 mM EDTA, pH8, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml Proteinase K) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Inkubation bei 50°C für 12 Stunden lysiert, gefolgt von einer Extraktion mit Phenol/Chloroform und gleichen Volumina von 7,5 M Ammoniumacetat und 100 EtOH präzipitiert. Die DNAs wurden in TE-Puffer resuspendiert.

[0145] Ungefähr 20 Mikrogramm genomischer DNA wurden mit HindIII oder XhoI bei 37°C für mindestens 4 Stunden vor der Fraktionierung auf 1% Agarosegelen verdaut. Die DNA-Fragmente wurden durch die Kapillartransfermethode auf Nitrozellulosemembranen (Southern, EM, J Mol Bio 98:503, 1975) übertragen und mit für menschliches Aurora1 und Aurora2 spezifischen Sonden, wie oben für die Northern Blot Analyse beschrieben, hybridisiert.

[0146] Die DNAs wurden mit HindIII geschnitten, da sowohl die AUR1 als auch die AUR2 cDNA eine einzelne Schnittstelle für dieses Restriktionsenzym enthalten. AUR1 zeigte eine einzelne 4,3 kb Bande von gleicher Intensität aus allen Quellen, was vermuten lässt, dass es in den vielen getesteten Tumortypen ein nicht-rearrangiertes Einzelkopie-Gen ist. Unter Bedingungen niedriger Stringenz waren wir jedoch in der Lage, 1,3 kb und 3,2 kb SacI Fragmente zu entdecken, die schwach an die AUR1 Sonde hybridisieren. Die Klonierung und Sequenzanalyse zeigte, dass diese Region ein intronloses AUR1-verwandtes Pseudogen (als AUR3 bezeichnet) mit vielen Frame-Shifts kodiert. Des Weiteren liegt direkt stromaufwärts des AUR3 Pseudogens eine Region mit komplexen invertierten Wiederholungen, für die vorhergesagt wird, dass sie eine sehr stabile Haarnadelschleife bilden. Die AUR3 DNA Sequenz ist beginnend von dem ersten Nukleotid der AUR1 cDNA zu AUR1 homolog. Direkt stromaufwärts dieser Stelle liegt die vorhergesagte Haarnadelschleife von AUR3. Wir untersuchen zur Zeit genomische Klone von AUR1, um zu bestimmen, ob sich die Homologie zu AUR3 stromaufwärts von diesem Nukleotid fortsetzt und ob die AUR1 cDNA eine ähnliche Haarnadelschleife einschließt oder diese dieser vorangeht. AUR2 zeigt in allen Quellen Banden bei 7,0 kb und 4,3 kb und eine schwächere Bande mit höherem Molekulargewicht bei ~ 10 kb. Diese Daten lassen vermuten, dass AUR2 ebenfalls ein Einzelkopie-Gen ist. Die multiplen Banden, die auf Blots mit AUR2 Sonden gesehen werden, sind wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass eine Volllängen cDNA Sonde verwendet wurde.

Beispiel 5: Sequenzanalyse von cDNA Klonen, die menschliches AURORA1 und AURORA2 kodieren

[0147] Die vollständige Sequenz von menschlichem Aurora1 und Aurora2 wurde für jeden Volllängenklon, der aus der menschlichen Pankreaskarzinombibliothek, aus normalem menschlichem Duodenum, und aus dem partiellen menschlichen Aurora1, das aus HEPM-Zellen isoliert wurde, bestimmt.

[0148] Die 1244 bp Nukleotidsequenz von menschlichem Aurora1 (AUR1_h) ist in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 gezeigt und enthält einen einzelnen offenen Leserahmen, der ein Polypeptid von 344 Aminosäuren

kodiert. Die AUR_h kodierende Region wird von einer 54 Nukleotiden langen 5'-untranslatierten Region und einer 132 Nukleotiden langen 3'-untranslatierten Region, die mit einem Poly(A) Schwanz endet flankiert.

[0149] Die 2198 bp Nukleotidsequenz von menschlichem Aurora2 (AUR2_h) ist in SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 gezeigt und enthält einen einzelnen offenen Leserahmen, der ein Polypeptid von 403 Aminosäuren kodiert. Die AUR2_h kodierende Region wird von einer 200 Nukleotiden langen 5'-untranslatierten Region und einer 768 Nukleotiden langen 3'-untranslatierten Region flankiert.

[0150] Die Sequenzen der AUR1 und AUR2 cDNAs sowohl von menschlichem Pankreastumoren als auch normalem menschlichen Duodenum wurden sequenziert, mit keinen Sequenzunterschieden mit Ausnahme von einigen wahrscheinlich polymorphen Stellen. Diese Mehrdeutigkeiten schließen ein:

cDNA	Nukleotid	Bemerkung
AUR1	1174	Ein Klon hat Poly A insertiert
	873	T in allen duodenalen Klonen, C in Pankreastumor
	469	T in einem Klon, C in allen anderen
	848	G in einem Klon, A in allen anderen - ändert Aminosäure E zu G
	1097	G in einem Klon, T in 2 anderen
	956	G in einem Klon, A in 4 anderen
	29	Splice zu 103 in 5 Klonen, kein Splice (wie in 5 Klonen gezeigt)
AUR2	349	T in 1 Klon, C in multiplen anderen (ändert Aminosäure P zu L)
	369	A in 3 Klonen, G in multiplen anderen (ändert Aminosäure V zu I)

[0151] Die C-terminalen Teile von AUR1 und AUR2 erhalten alle 12 Unterdomänen, die für eukaryotische Proteinkinasen charakteristisch sind. Diesen AUR1 und AUR2 Kinasedomänen geht eine N-terminale Domäne von 74 bzw. 130 Aminosäuren Länge voraus. Der Vergleich der AUR1 und AUR2 Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen (SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:4) mit den verfügbaren DNA- und Proteinsequenzdatenbanken zeigte an, dass sie mit Ausnahme von mehreren EST-Sequenzen, zu denen sie eine hohe Sequenzidentität aufweisen, einzigartig sind. Sie haben jedoch sowohl in der N-terminalen als auch der katalytischen Domäne eine bemerkenswerte Homologie mit den Drosophila Aurora und Saccharomyces cerevisiae IPL1-Genen. Des Weiteren ist es wahrscheinlich, dass zwei nicht publizierte Datenbank Einträge nahe Homologe aus Xenopus laevis sind (p46APK – GB Accession #Z17206 und p46BPK – GB Accession #Z17207).

[0152] Die N-terminalen Domänen von Auroras aus Mensch, Frosch, Drosophila und Hefe weisen begrenzte Sequenzidentität auf. AUR2 besitzt eine Vielzahl von Glutamaten, die oft in Paaren vorhanden sind und durch einen einzelnen Rest getrennt werden.

[0153] Ein Vergleich der katalytischen Domänen dieser Proteine zeigt, dass AUR1 70% Aminosäureidentität mit AUR2, 61% mit dem Drosophila Aurora und 45% mit dem Hefe IPL1 Gen aufweist. Die AUR2 Kinase besitzt 60% Aminosäureidentität mit dem Drosophila Protein und 45% Identität mit dem Hefe IPL1. Sowohl AUR1 als auch AUR2 besitzen weniger als 45% Homologie mit allen anderen bekannten Säugetierkinasen (die nächste ist cAMP-abhängige Proteinkinase A), was vermuten lässt, dass sie Homologe dieser Drosophila und Hefe Kinasen sind.

[0154] AUR1 und AUR2 enthalten beide eine cAMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierungsstelle (THR232 von AUR1 und THR288 von AUR2) das in den Drosophila und Hefe-Homologen konserviert und in

der Cyclin-abhängigen Kinase p34cdc2 eine bekannte Regulationsstelle ist. AUR2 enthält eine zusätzliche PKA-Stelle bei SER342. Beide Proteine besitzen ebenfalls mehrere Casein Kinase II (fünf bzw. sechs für AUR1 und AUR2) und Proteinkinase C (vier bzw. zehn für AUR1 und AUR2) Phosphorylierungsstellen. AUR2 besitzt ebenfalls eine einzelne Tyrosinphosphorylierungs-Konsensusstelle bei TYR334, die in dem Drosophila Aurora ebenfalls konserviert, aber in AUR1 oder Hefe IPL1 nicht vorhanden ist.

[0155] Faszinierenderweise führen natürliche Mutanten des Drosophila Aurora AUR_dm und Hefe IPL1 Gens zu asymmetrischer Kernteilung, was zu falscher Chromosomentrennung und atypischen monopolen Spindeln führt. Dieser Phänotyp scheint aus einem Fehler bei der Centrosomentrennung zu resultieren. Die damit verbundene Architektur der Mikrotubuli erscheint unbeeinflusst. Natürliche Mutanten von Zielaminosäureresten, die zwischen den menschlichen Auroras streng konserviert sind, sowohl in Drosophila als auch Hefe unterstützen weiter die Annahme, dass sie funktionelle Homologe sind. Die korrespondierenden Reste in AUR1, die in natürlichen Mutanten von AUR_dm oder IPL1 gefunden werden sind GLU125, THR232, PRO312 und HIS324. Alle diese Mutationen sind innerhalb der katalytischen Domäne und bemerkenswerterweise stellt eine die konservierte PKA-Phosphorylierungsstelle dar. Eine zusätzliche Mutation in AUR_dm bei ASP47 ist ein nicht-konservierter Rest in der N-terminalen Domäne.

[0156] Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die katalytische Aktivität in der Tat in niederen Organismen eine zentrale Rolle in der Biologie der Replikation oder Trennung von Centrosomen spielt und deuten an, dass die menschlichen Auroras eine entsprechende Rolle in Säugetierzellen spielen könnten.

Beispiel 6: Rekombinante Expression von AURORA und Herstellung eines AURORA2 Expressionsvektors

[0157] Expressionskonstrukte wurden durch PCR-unterstützte Mutagenese, in welcher die gesamten kodierenden Domänen von Aurora1 und Aurora2 an ihren carboxy-terminalen Enden mit dem Hämophilus Influenza Hemagglutinin (HA) Epitop YPYDVPDYAS (SEQ ID NO:21) (Pati, 1992) markiert waren, erzeugt. Diese Konstrukte wurden in zwei Säugetierexpressionsvektoren: pLXSN (Miller, A.D. & Rosman, G.J., Biotechniques 7, 980-988, 1989) für die Erzeugung von viruserzeugenden Linien und pRK5 für transiente Expressionsanalyse eingebracht. Die Inserts wurden so entworfen, dass sie von einzigartigen BamHI und NotI-Stellen flankiert werden und wurden direkt an der 5'-BamHI und 3'-NotI-Stelle in pLXSN oder pRK5 kloniert.

[0158] Die BamHI-NotI Vollängen AUR1 und AUR2 Konstrukte wurden ebenfalls in pRS316 (Liu, H. et al, Genetics 132:665-673, 1992) ligiert. Dieser Vektor enthält einen Galaktose-induzierbaren Promoter in einem centromeren Shuttlevektor für die Expression in Saccharomyces cerevisiae. Diese sind für die Bestimmung, ob die menschlichen Gene die verwandte temperatursensitive Hefe IPL1 Mutante, die mit AUR1 nahe verwandt ist, komplementieren können. Zusätzlich wurden Fusionskonstrukte, die die N-terminale Domäne von Hefe IPL1 fusioniert mit der C-terminalen Kinasedomäne von AUR1 und AUR2 enthalten, erzeugt. Diese wurden durch die Insertion einer künstlichen ClaI Stelle am 5'-Ende der Kinasedomäne der Kinasen an der konservierten Asp-Asp-Phe-Glu-Sequenz; hergestellt.

[0159] Durch Mutation des invarianten Lys (Aminosäureposition 106 und 162 in AUR1 bzw. AUR2) zu einem Met durch PCR-Mutagenese wurden sowohl in pLXSN als auch pRK5 dominant negative AUR1 und AUR2 Konstrukte hergestellt. Diese Konstrukte werden als AUR1KM und AUR2KM bezeichnet. Konstitutiv aktive Formen von AUR1 und AUR2 wurden durch die Mutation der DNA die die Phosphorylierungsstelle kodiert (232 und 288) zu einem Asp, was zu AUR1TD und AUR2TD führte, erzeugt.

[0160] Sowohl in pLXSN als auch pRK5 wurden ebenfalls Expressionskonstrukte, die nur die N-terminale, nicht-katalytische Domäne von AUR1 und AUR2 enthalten, hergestellt. Diese wurden durch PCR aus den Stammkonstrukten hergestellt und enthalten die N-terminalen 77 Aminosäuren von AUR1 und die N-terminalen 132 Aminosäuren von AUR2.

[0161] Die gesamten offenen Leserahmen von AUR1 und AUR2 (kein HA-tag) ausschließlich der Start-Methionine wurden durch PCR erzeugt und für die bakterielle Produktion von GST-Fusionsproteinen für die Immunisierung von Kaninchen zur Antikörperproduktion in einen pGEX-Vektor ligiert.

Beispiel 7: Erzeugung von Virus-produzierenden AURORA-Zelllinien

[0162] Um eine Virusstammlösung mit hohem Virustiter zu erzeugen, wurden rekombinante pLXSN Konstrukte, die entweder AUR1 oder AUR2 Gene enthalten, unter Verwendung von CaCl₂ vermittelter Transfektion in eine amphotrope Helferzelllinie PA317 transfiziert. Nach Selektion auf G418, wurden die Zellen auf normalem

Medium ohne G418 (500 µg/ml) ausplattiert. Die Überstände von resistenten Zellen wurden verwendet, um die ökotrope Helferzelllinie GP+E86 zu infizieren und die Zellen wurden wieder auf G418 selektiert. Resistente Zellen wurden wieder vom G418 genommen und die Überstände alle 8-12 Stunden geerntet und als Virusstämme vereinigt (Redemann, N., Holzmann, B., Wagner, E.F., Schlessinger, J., & Ullrich, A., Mol. Cell. Biol. 12, 491-498, 1992). Die Titer der viralen Stammlösungen betrugen typischerweise $\sim 10^6$ /ml.

Beispiel 8: Retrovirale Infektion von NIH-3T3 Zellen mit AURORAS

[0163] NIH-3T3 und BALB/3T3-Zellen wurden in 100 mm Platten DMEM (Gibco), das 10% fötales Kälberserum (FCS) enthielt, wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit dem AUR1 und AUR2 Retrovirus durch die Zugabe von ungefähr 3 ml viralem Überstand zu 15 ml Kulturmedium für ungefähr 24 Stunden superinfiziert. Zellen, die die retroviralen Konstrukte exprimierten, wurden dann durch das Wachstum in DMEM/10% FCS ergänzt mit 500 µg/ml G418 selektiert.

Beispiel 9: Erzeugung von AURORA-spezifischen Immunreagenzien

[0164] AURORA-spezifische Immunreagenzien wurden in Kaninchen gegen KLH-konjugierte synthetische Peptide, die entweder der N-terminalen Region von AUR2 (¹⁰⁴SAPENNPEEQLASK¹¹⁷) (SEQ ID NO:22) und (⁹⁰RPLNNTQKSKQPL¹⁰²) (SEQ ID NO:23) oder dem N-Terminus oder der N-terminalen Domäne von menschlichem AUR1 (¹MAQKENSYPWPYG¹³) (SEQ ID NO: 24) und (⁵³PGQKVMENSSGTP⁶⁵) entsprachen, erzeugt. Zusätzliche Immunreagenzien wurden durch das Immunisieren von Kaninchen mit bakteriell exprimierten Voll-längen AUR1 und AUR2 GST-Fusionsproteinen erzeugt.

Beispiel 10: Transiente Expression von AURORAS in Säugetierzellen

[0165] Die pRK5 Expressionsplasmide (10 µg DNA/100 mm Platte), die die HA-markierten AUR1 und AUR2 Gene enthielten, wurden mit Lipofectamin (Gibco BRL) in COS und 293 Zellen eingeführt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen in 0,5 ml Solubilisierungspuffer (20 mM HEPES pH7,35, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Aprotinin) geerntet. Probenaliquots wurden durch SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) auf 15% Acrylamid/0,5% Bis-Acrylamid-Gelen aufgelöst und elektrophoretisch auf Nitrozellulose überführt. Unspezifische Bindung wurde durch die Vorinkubation der Blots in Blotto (Phosphat gepufferte Salzlösung, die 5% w/v entfettetes Milchpulver und 0,2% v/v Nonidet P-40 (Sigma) enthält) blockiert und rekombinantes Protein wurde unter Verwendung eines murinen Mab gegen den HA-Dekapeptid Marker nachgewiesen. Alternativ kann das rekombinante Protein unter Verwendung von verschiedenen AUR1- oder AUR2-spezifischen Antisera nachgewiesen werden.

Beispiel 11: Basisches Myelin-Protein ist ein künstliches Substrat für AUR1 und AUR2 Kinase

Methode

[0166] Menschliche colorektale Adenokarzinom SW480 Zellen wurden in RPMI 1640 plus 10% fötales Kälberserum, L-Glutamin, Penicillin und Streptomycin kultiviert. Konfluente Kulturen von SW480 Zellen wurden drei Mal mit eiskalter Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und dann in 1 ml eiskaltes PBS geschabt. Die Zellen wurden bei 4°C mit 1000 rpm zentrifugiert, das PBS abgezogen und das resultierende Zell-pellet bei -80°C aufbewahrt. Die Pellets von drei 15 cm Platten wurden auf Eis aufgetaut und in einem Gesamtvolumen von 1 mM Kinase Lyse-Puffer 50 mM HEPES pH 7,4, 100 mM KCl, 25 mM NaF, 1 mM NaVO₃, 0,5% NP40, 1 mM DTT, 2 µg/ml Aprotinin und 1 µg/ml Leupeptin resuspendiert und sanft für 20 Minuten 4°C rotiert. Die Proben wurden dann bei 10.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der resultierende Überstand in ein sauberes 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und auf Eis aufbewahrt oder gelagert. Die Proteinkonzentration wurde durch Bradford-Analyse bestimmt. Ein Milligramm Gesamtprotein wurde mit 10 µl Protein-A-Sepharose (Boehringer) für 15 Minuten bei 4°C vorgereinigt, gefolgt durch die Zugabe von 2 µl von entweder Kaninchen Prä-Immunserum, Affinitäts-gereinigtes Aurora1 Peptid Antiserum, Affinitäts-gereinigtes Aurora1 Peptid Antiserum plus 6 µg konkurrierendem Aurora1 Peptid, Affinitäts-gereinigtem Aurora2 Peptid Antiserum oder Affinitäts-gereinigtem Aurora2 Peptid Antiserum plus 6 µg konkurrierendem Aurora2 Peptid und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden 10 µl Protein A-Sepharose zugegeben und die Inkubation für zusätzliche 45 Minuten bei 4°C fortgesetzt. Die Röhrchen wurden kurz zentrifugiert, um den Antikörper-Protein-A-Sepharose Komplex zu pelletieren und der resultierende Überstand wurde abgezogen. Das Antikörper-Protein-A-Sepharose-Pellet wurde zweimal mit 0,5 ml Kinase Lyse-Puffer gewaschen, gefolgt von einem Waschen mit 0,5 ml Kinasepuffer (20 mM HEPES pH 7,4, 125 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM NaF, 1 mM NaVO₃, und 1 mM DTT). Das Antikörper-Protein A-Sepharose-Pellet wurde in 20 µl Kinasepuffer, der 5 µCi [γ -³²P] ATP

und 0,5 mg/ml basisches Myelin-Protein (Sigma) enthielt, resuspendiert, für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, wonach 10 µl Proteinprobenpuffer (200 mM Tris-Cl pH 6,8, 40% Glycerol, 730 mM B-Mercaptoethanol, 0,4% SDS und 0,05% Bromphenol Blau) zugegeben wurde. Die Röhrchen wurden gut gemischt und für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden auf einem 18% SDS Polyacrylamidgel aufgelöst und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Ergebnisse

[0167] Aurora1 und Aurora2 Immunkomplexe waren in der Lage, basisches Myelin-Protein zu phosphorylieren. Wenn bei der Immunopräzipitation ein konkurrierendes Peptid verwendet wurde, waren weder Aurora1 noch Aurora2 Antisera Immunkomplexe in der Lage, basisches Myelin-Protein mehr als die Präimmunserumkontrolle zu phosphorylieren. Das lässt vermuten, dass die beobachtete Kinaseaktivität auf Aurora1 und Aurora2 zurückzuführen ist und nicht auf andere Proteine, die in dem Immunkomplex vorhanden sind.

[0168] Diese Beobachtung erlaubt die Reinigung von aktiver Aurora 1 und 2 Kinase durch die Verwendung von basischem Myelin-Protein als Substrat, um die Kinaseaktivität zu verfolgen. Sie erlaubt ebenfalls die Entwicklung eines in vitro Kinaseassays, der rekombinantes Aurora1 und Aurora2 Protein verwendet. Ferner erlaubt ein in vitro Aurora1 und 2 Kinaseassay kleine Molekülsammlungen nach Inhibitoren der Aurora1 und 2 Kinasen durch das Messen der Phosphorylierungsinhibition von basischem Myelin-Protein zu screenen.

[0169] Die hierin veranschaulichend beschriebene Erfindung kann geeigneterweise in der Abwesenheit von jedem Bestandteil oder Bestandteilen, Beschränkung oder Beschränkungen, die nicht spezifisch hierin offenbart sind, durchgeführt werden. Die Begriffe und Bezeichnungen, die verwendet wurden, werden als beschreibende und nicht als begrenzende Bezeichnungen verwendet und es besteht keine Absicht, dass durch die Verwendung von solchen Ausdrücken und Bezeichnungen irgendwelche Äquivalente der gezeigten und beschriebenen Eigenschaften oder Teilen davon ausgeschlossen werden, sondern es ist klar zu erkennen, dass verschiedene Modifikationen innerhalb des Umfangs der beanspruchten Erfindung möglich sind. Daher ist es selbstverständlich, dass, obwohl die vorliegende Erfindung spezifisch über bevorzugte Ausführungsformen und optionale Merkmale offenbart worden ist, der Durchschnittsfachmann auf Modifikationen und Variationen der hierin offenbarten Konzepte zurückgreifen kann und dass es beabsichtigt ist, dass solche Modifikationen und Variationen innerhalb des Umfangs dieser Erfindung, wie durch die folgenden Ansprüche definiert, liegen.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Mossie, Kevin G.

Plowman, Gregory D.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Anwendung von humanem Aurora

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Lyon & Lyon

(B) STRASSE: 633 West Fifth Street, Suite 4700

(C) STADT: Los Angeles

(D) STAAT: CA

(E) LAND: USA

(F) ZIP: 90071-2066

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUM TYP: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: US

(B) EINREICHUNGSDATUM:

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) ANWALT/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Warburg, Richard J.

(B) REGISTRATIONSNUMMER: 32,327

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION

(A) TELEFON: (213) 489-1600

(B) TELEFAX: (213) 955-0440

(C) TELEX: 67-3510

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR.1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN

(A) LÄNGE: 1244 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.1:

```
CGGGAGAGTA GCACTGCCCTT GGACCCACAG TCTCTCCCC CTTCTCTCT AAGGATGGCC 60
CAGAAGGAGA ACTCTACCC CTGGCCCTAC GGCCGACAGA CGGCTCCATC TGGCCTGAGC120
ACCCTGCCCC AGCGAGTCCT CCGGAAGAG CCTGTCACCC CATCTGCACT TGTCTCATG180
AGCCGCTCCA ATGTCCAGCC CACAGCTGCC CCTGGCCAGA AGGTGATGGA GAATAGCAGT240
GGGACACCCG ACATCTTAAC GCGGCACTTC ACAATTGATG ACTTGAGAT TGGGCGTCCT300
CTGGGCAAAG GCAAGTTTGG AAACGTGTAC TTGGCTCGGG AGAAGAAAAG CCATTTTCATC360
GTGGCGCTCA AGTCTCTCTT CAAGTCCCAG ATAGAGAAGG AGGGCGTGGA GCATCAGCTG420
CGCAGAGAGA TCGAAATCCA GGCCACCTG CACCATCCCA ACATCCTGCG TCTCTACAAC480
TATTTTTATG ACCGGAGGAG GATCTACTTG ATTCTAGAGT ATGCCCCCG CGGGGAGCTC
540
```

TACAAGGAGC TGCAGAAGAG CTGCACATTT GACGAGCAGC GACAGCCAC GATCATGGAG600
 GAGTTGGCAG ATGCTCTAAT GTACTGCCAT GGGAGAAGG TGATTCACAG AGACATAAAG660
 CCAGAAAATC TGCTCTTAGG GCTCAAGGGA GAGCTGAAGA TTGCTGACTT CGGCTGGTCT720
 GTGCATGCGC CCTCCCTGAG GAGGAAGACA ATGTGTGGCA CCTGGACTA CCTGCCCCCA780
 GAGATGATTG AGGGGCGCAT GCACAATGAG AAGGTGGATC TGTGGTGCAT TGGAGTGCTT840
 TGCTATGAGC TGCTGGTGGG GAACCCACCC TTCGAGAGTG CATCACACAA CGAGACCTAT900
 CGCCGZATCG TCAAGGTGGA CCTAAAGTTC CCCGCTTCTG TGCCCACGGG AGCCCAGGAC960
 CTCATCTCCA AACTGCTCAG GCATAACCCC TCGGAACGGC TGCCCCTGGC CCAGGTCTCA020
 GCCCACCTT GGGTCCGGG CAACTCTCGG AGGGTGCTGC CTCCCTCTGC CCTTCAATCT080
 GTCGCTGAT GGTCCCTGTC ATCACTCGG GTGCGTGTGT TTGTATGTCT GTGTATGTAT140
 AGGGGAAAGA AGGGATCCCT AACTGTTCCC TTATCTGTT TCTACCTCCT CCTTGTGTTA200
 ATAAAGGCTG AAGCTTTTGT TAAAAAACA AAAAAAAAAA AAAA 1244

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 2198 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.2:

GGGATATCTC AGTGGCGGAC GAGGACGGCG GGGACAAGGG GCGGCTGGTC GGAGTGGCGG 50
 ACGTCAAGTC CCCTGTCGGT TCCTCGGTCC CTGAGTGTCC TTGGCGCTGC CTTGTGCCCG120
 CCCAGCGCCT TTGCATCCGC TCCTGGGCAC CGAGGCGCCC TGTAGGATAC TGCTTGTTAC180
 TTATTACAGC TAGAGGCATC ATGGACCGAT CTAAGAAAA CTGCATTTCA GGACCTGTTA240
 AGGCTACAGC TCCAGTTGGA GGTCCAAAAC GTGTTCTCGT GACTCAGCAA TTTCCCTGTGTC300
 AGAATCCATT ACCTGTAAAT AGTGGCCAGG CTCAGCGGGT CTTGTGTCCT TCAAATTCIT360

CCCAGCGCGT TCCTTTGCAA GCACAAAAGC TTGTCTCCAG TCACAAGCCG GTTCAGAATC420
 AGAAGCAGAA GCAATTGCAG GCAACCAGTG TACCTCATCC TGTCTCCAGG CCACTGAATA480
 ACACCCAAAA GAGCAAGCAG CCCCTGCCAT CGGCACCTGA AAATAATCCT GAGGAGGAAC540
 TGGCATCAAA ACAGAAAAAT GAAGAATCAA AAAAGAGGCA GTGGGCTTTG GAAGACTTTG600
 AAATTGGTGG CCCTCTGGGT AAAGGAAAGT TTGGTAATGT TTATTTGGCA AGAGAAAAGC660
 AAAGCAAGTT TATTCTGGCT CTTAAAGTGT TATTTAAAGC TCAGCTGGAG AAAGCCGGAG720
 TGGAGCATCA GCTCAGAAGA GAAGTAGAAA TACAGTCCCA CCTTCGGCAT CCTAATATTC780
 TTAGACTGTA TGGTTATTTT CATGATGCTA CCAGAGTCTA CCTAATTCTG GAATATGCAC840
 CACTTGGAAC AGTTTATAGA GAACTTCAGA AACTTTCAAA GTTTGATGAG CAGAGAACTG900
 CTACTTATAT AACAGAATTG GCAAATGCCC TGCTTACTG TCATTGGAAG AGAGTTATTC960
 ATAGAGACAT TAAGCCAGAG AACTTACTTC TTGGATCAGC TGGAGAGCTT AAAATTGCAG020
 ATTTTGGGTG GTCAGTACAT GCTCCATCTT CCAGGAGGAC CACTCTCTGT GGCACCCTGE080
 ACTACCTGCC CCCTGAAATG ATTGAAGGTC GGATGCATGA TGAGAAGGTG GATCTCTGGA140
 GCCTTGGAGT TCTTTGCTAT GAATTTTATG TTGGGAAGCC TCCTTTTGAG GCAAACACAT200
 ACCAAGAGAC CTACAAAAGA ATATCACGGG TTGAATTCAC ATTCCCTGAC TTTGTAACAG260
 AGGGAGCCAG GGACCTCATT TCAAGACTGT TGAAGCATAA TCCCAGCCAG AGGCCAATGT320
 TCAGAGAAGT ACTTGAACAC CCTGGATCA CAGCAAATTC ATCAAAACCA TCAAATTGCT380
 AAAACAAAGA ATCAGCTAGC AAACAGTCTT AGGAATCGTG CAGGGGGAGA AATCCTTGAG440
 CCAGGGCTGC CATATAACCT GACAGGAACA TGCTACTGAA GTTTATTTTA CCATTGACTE500
 CTGCCCTCAA TCTAGAACGC TACACAAGAA ATATTTGTTT TACTCAGCAG GTGTGCCTTA560
 ACCTCCCTAT TCAGAAAGCT CCACATCAAT AAACATGACA CTCTGAAGTG AAAGTAGCCA620
 CGAGAAATTGT GCTACTTATA CTGGTTCATA ATCTGGAGGC AAGGTTGAC TGCAGCCGCT680
 CCGTCAGCCT GTGCTAGGCA TGGTGTCTTC ACAGGAGGCA AATCCAGAGC CTGGCTGTGE740
 GGAAAGTGAC CACTCTGCCC TGACCCCGAT CAGTTAAGGA GCTGTGCAAT AACCTTCCTA800
 GTACCTGAGT GAGTGTGTAA CTTATTGGGT TGGCGAAGCC TGGTAAAGCT GTTGAATGA860
 GTATGTGATT CTTTTAAGT ATGAAAATAA AGATATATGT ACAGACTTGT ATTTTTCCTE920
 TGGTGGCATT CCTTTAGGAA TGCTGTGTGT CTGTCCGGCA CCCCGGTAGG CCTGATTGGG980
 TTTCTAGTCC TCCTTAACCA CTTATCTCCC ATATGAGAGT GTGAAAATA GGAACACGT0040

CTCTACCTCC ATTTAGGGAT TTGCTGGGA TACAGAAGAG GCCATGTGTC TCAGAGCTGZ100
 TAAGGGCTTA TTTTTTAAA ACATTGGAGT CATAGCATGT GTGTAAACTT TAAATATGCh160
 AATAAATAAG TATCTATGTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2198

(2) INFORMATIONEN FÜR SEQ ID Nr. 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 344 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 3:

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

Gln Ala His Leu His His Pro Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Asn Tyr Phe
 130 135 140
 Tyr Asp Arg Arg Arg Ile Tyr Leu Ile Leu Glu Tyr Ala Pro Arg Gly
 145 150 155 160
 Glu Leu Tyr Lys Glu Leu Gln Lys Ser Cys Thr Phe Asp Glu Gln Arg
 165 170 175
 Thr Ala Thr Ile Met Glu Glu Leu Ala Asp Ala Leu Met Tyr Cys His
 180 185 190
 Gly Lys Lys Val Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu
 195 200 205
 Gly Leu Lys Gly Glu Leu Lys Ile Ala Asp Phe Gly Trp Ser Val His
 210 215 220
 Ala Pro Ser Leu Arg Arg Lys Thr Met Cys Gly Thr Leu Asp Tyr Leu
 225 230 235 240
 Pro Pro Glu Met Ile Glu Gly Arg Met His Asn Glu Lys Val Asp Leu
 245 250 255
 Trp Cys Ile Gly Val Leu Cys Tyr Glu Leu Leu Val Gly Asn Pro Pro
 260 265 270
 Phe Glu Ser Ala Ser His Asn Glu Thr Tyr Arg Arg Ile Val Lys Val
 275 280 285
 Asp Leu Lys Phe Pro Ala Ser Val Pro Thr Gly Ala Gln Asp Leu Ile
 290 295 300
 Ser Lys Leu Leu Arg His Asn Pro Ser Glu Arg Leu Pro Leu Ala Gln
 305 310 315 320
 Val Ser Ala His Pro Trp Val Arg Ala Asn Ser Arg Arg Val Leu Pro
 325 330 335
 Pro Ser Ala Leu Gln Ser Val Ala
 340

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr. 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 403 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 4:

```

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

```

```

Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Gly Ser Ala Gly Glu Leu Lys Ile
      260              265              270

Ala Asp Phe Gly Trp Ser Val His Ala Pro Ser Ser Arg Arg Thr Thr
      275              280              285

Leu Cys Gly Thr Leu Asp Tyr Leu Pro Pro Glu Met Ile Glu Gly Arg
      290              295              300

Met His Asp Glu Lys Val Asp Leu Trp Ser Leu Gly Val Leu Cys Tyr
      305              310              315              320

Glu Phe Leu Val Gly Lys Pro Pro Phe Glu Ala Asn Thr Tyr Gln Glu
      325              330              335

Thr Tyr Lys Arg Ile Ser Arg Val Glu Phe Thr Phe Pro Asp Phe Val
      340              345              350

Thr Glu Gly Ala Arg Asp Leu Ile Ser Arg Leu Leu Lys His Asn Pro
      355              360              365

Ser Gln Arg Pro Met Leu Arg Glu Val Leu Glu His Pro Trp Ile Thr
      370              375              380

Ala Asn Ser Ser Lys Pro Ser Asn Cys Gln Asn Lys Glu Ser Ala Ser
      385              390              395              400

Lys Gln Ser

```

Patentansprüche

1. Ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes Nukleinsäuremolekül, **dadurch gekennzeichnet**, dass es für ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr.3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert.
2. Das Nukleinsäuremolekül aus Anspruch 1, wobei besagte Nukleinsäure eine menschliche Nukleinsäure ist.
3. Das Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei besagtes Molekül für mindestens 200, vorzugsweise mindestens 300 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert.
4. Eine Nukleinsäuresonde für die Detektion einer Nukleinsäure, die für ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, kodiert, wobei besagte Probe zu der Gesamtlänge von besagter Nukleinsäure hoch komplementär ist, oder die für ein AUR-2-Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert, wobei besagte Probe zu der Gesamtlänge von besagter Nukleinsäure hoch komplementär ist, vorausgesetzt, dass besagte Nukleinsäuresonde weder EST Sequenz yg60d11.r1 (GenBank gi: 983571, Accession No. R97911) noch EST97212 (GenBank gi: 618232, Accession No. T36134) noch ein Komplementär davon ist.
5. Die Sonde gemäß Anspruch 4, wobei besagte Sonde hoch komplementär zu einer Nukleinsäure ist, die mindestens 200, vorzugsweise mindestens 300 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert.
6. Ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, dass es ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert und ein Vektor oder Promoter, der wirksam ist, die Transkription in eine r. Wirtszelle zu initiieren.

7. Ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Transkriptionsregion, die in einer Zelle funktional ist, eine Sequenz die komplementär zu einer RNA-Sequenz ist, die ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert, und eine transkriptionelle Terminationsregion, die in einer Zelle funktional ist, umfasst.

8. Ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Polypeptid ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, ist.

9. Das AUR-1 oder AUR-2 Polypeptid gemäß Anspruch 8, wobei besagtes Polypeptid mindestens 200, vorzugsweise 300 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, umfasst.

10. Das AUR-1 oder AUR-2 Polypeptid gemäß Anspruch 8 oder Anspruch 9, wobei besagtes Polypeptid aus einem Säugetier isoliert, gereinigt oder angereichert ist.

11. Das AUR-1 oder AUR-2 Polypeptid gemäß Anspruch 10, wobei besagtes Polypeptid aus einem Menschen isoliert, gereinigt oder angereichert ist.

12. Ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei besagtes Polypeptid ein AUR-1 Polypeptid ist.

13. Ein Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei besagtes Polypeptid ein AUR-2 Polypeptid ist.

14. Ein Antikörper, dadurch gekennzeichnet, dass er eine spezifische Bindungsaffinität für ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, besitzt.

15. Der Antikörper gemäß Anspruch 14, wobei besagtes Polypeptid aus einem Säugetier isoliert, gereinigt oder angereichert ist.

16. Der Antikörper gemäß Anspruch 15, wobei besagtes Polypeptid aus einem Menschen isoliert, gereinigt oder angereichert ist.

17. Der Antikörper gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei besagtes Polypeptid ein AUR-1 Polypeptid ist.

18. Der Antikörper gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei besagtes Polypeptid ein AUR-2 Polypeptid ist.

19. Hybridom, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Antikörper produziert, der eine spezifische Bindungsaffinität für ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder für ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, besitzt.

20. Das Hybridom gemäß Anspruch 19, wobei besagtes AUR-1 oder AUR-2 Polypeptid mindestens 200, vorzugsweise 300 zusammenhängende Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 oder SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, umfasst.

21. Das Hybridom gemäß Anspruch 19 oder Anspruch 20, wobei besagtes Polypeptid aus einem Säugetier isoliert, gereinigt oder angereichert ist.

22. Das Hybridom gemäß Anspruch 21, wobei besagtes Polypeptid aus einem Menschen isoliert, gereinigt oder angereichert ist.

23. Das Hybridom gemäß Anspruch 20 oder Anspruch 21, wobei besagtes Polypeptid ein AUR-1 Polypeptid ist.

24. Das Hybridom gemäß Anspruch 20 oder Anspruch 21, wobei besagtes Polypeptid ein AUR-2 Polypeptid ist.

25. Die Verwendung einer Nukleinsäuresonde gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 in einem Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins einer Nukleinsäure, die für ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert.

26. Ein Kit zum Nachweis des Vorhandenseins einer Nukleinsäure, die für ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, kodiert, der mindestens einen Behälter, der eine Nukleinsäuresonde gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält, umfasst.

27. Die Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18 in einem Verfahren zum Nachweis eines AUR-1 Polypeptids mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder einem AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist.

28. Ein Kit zum Nachweis des Vorhandenseins eines AUR-1 Polypeptids mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder eines AUR-2 Polypeptids mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, das i) einen ersten Behälter, der einen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16 enthält und ii) einen zweiten Behälter, der ein Konjugat, das einen Bindungspartner des Antikörpers und einen Marker umfasst, enthält, umfasst.

29. Ein Verfahren zum Nachweis einer Verbindung, die in der Lage ist, an ein AUR-1 oder AUR-2 Polypeptid zu binden, und das den Schritt der Inkubation der Verbindung mit einem AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder einem AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, und den Nachweis des Vorhandenseins der Verbindung, die an besagtes AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid gebunden ist, umfasst.

30. Ein Verfahren zur Detektion eines Agonisten oder Antagonisten der AUR-1 oder AUR-2 Aktivität, das die Inkubation von Zellen, die ein AUR-1 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 3 gezeigt ist, oder ein AUR-2 Polypeptid mit mindestens 100 zusammenhängenden Aminosäuren der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist, produzieren, in Anwesenheit einer Verbindung und den Nachweis von Veränderungen im Aktivitätsgrad von besagtem AUR-1 und/oder AUR-2 Polypeptid umfasst.

31. Ein Verfahren gemäß Anspruch 30, wobei besagte AUR-1- oder AUR-2-Aktivität die Phosphorylierung eines Substratmoleküls ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen