



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 26 742 T2 2006.06.14

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 073 723 B1

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 9/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 26 742.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/08150**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 918 539.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/053036**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **21.10.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.02.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **17.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.06.2006**

(30) Unionspriorität:

**81784 P 14.04.1998 US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

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

(72) Erfinder:

**PLOWMAN, Gregory, San Carlos, US; MARTINEZ, Ricardo, Foster City, US; WHYTE, David, Belmont, US**

(74) Vertreter:

**Viering, Jentschura & Partner, 80538 München**

(54) Bezeichnung: **STE20-VERWANDTE PROTEINKINASEN**

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 eingelebt, 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

### Verwandte Anmeldungen

**[0001]** Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität der vorläufigen US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 60/081,784 von Plowman und Martinez, mit dem Titel STE20 verwandte Proteinkinasen, die am 14. April 1998 eingereicht wurden (Lyon & Lyon Aktennummer 232/279).

### Gebiet der Erfindung

**[0002]** Die vorliegende Erfindung betrifft neue Kinase-Polypeptide, Nukleotidsequenzen, die für die neuen Kinase-Polypeptide kodieren, als auch verschiedene Produkte und Verfahren, die für die Diagnose und Behandlung verschiedener Kinase verwandten Erkrankungen und Bedingungen verwendbar sind.

### Hintergrund der Erfindung

**[0003]** Die folgende Beschreibung des Hintergrunds der Erfindung wird bereitgestellt, um zum Verständnis der Erfindung beizutragen, ist aber nicht als Eingeständnis zu sehen, Stand der Technik der Erfindung zu sein oder zu beschreiben.

**[0004]** Zelluläre Weitergabe von Signalen ist ein fundamentaler Mechanismus, wobei externe Stimuli, die verschiedene zelluläre Prozesse regulieren, das Innere der Zellen betreffen. Eine der biomechanischen Schlüsselmechanismen der Signalweitergabe schließt die reversible Phosphorylierung von Proteinen ein, was die Regulierung der Aktivität alter Proteine durch Verändern ihrer Struktur und Funktion ermöglicht.

**[0005]** Die am besten charakterisierten Proteinkinasen in Eukaryoten phosphorylieren Proteine an der Hydroxyleinheit von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Diese Kinasen fallen hauptsächlich in zwei Gruppen, in die, die für die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen spezifisch sind und in die, die für die Phosphorylierung von Tyrosinen spezifisch sind. Einige Kinasen, die als „Doppelspezifität“ Kinasen bezeichnet werden, sind in der Lage, an Tyrosin als auch an Serin/Threoninreste zu phosphorylieren.

**[0006]** Proteinkinasen können ebenso durch ihre Lage innerhalb der Zelle charakterisiert werden. Einige Kinasen sind Transmembran-rezeptorartige Proteine, die in der Lage sind, direkt ihre katalytische Aktivität als Antwort auf die externe Umgebung, wie z.B. die Bindung eines Liganden, zu ändern. Andere sind nicht-rezeptorartige Proteine, denen jede Transmembrandomain fehlt. Sie können in einer Vielzahl zellulärer Abschnitte von der inneren Oberfläche der Zellmembran bis zum Kern gefunden werden.

**[0007]** Viele Kinasen sind in regulatorische Kaskaden involviert, wobei ihre Substrate andere Kinasen beinhalten können, deren Aktivitäten von ihrem Phosphorylierungszustand reguliert werden. Schließlich wird die Aktivität einiger Downstream-Effektoren durch Phosphorylierung moduliert, die aus der Aktivierung eines solchen Weges resultieren.

**[0008]** Proteinkinasen sind eine der größten Familien von eukaryotischen Proteinen mit mehreren hundert bekannten Elementen. Diese Proteine teilen sich eine 250-300 Aminosäuredomain, die in 12 unterschiedliche Sub-Domains aufgeteilt werden kann, die die allgemeine katalytische Kernstruktur umfassen. Diese erhaltenen Proteinmotive sind kürzlich unter Verwendung von auf PCR-basierenden Klonierungsstrategien, die zu einer signifikanten Expansion der bekannten Kinasen führen, untersucht worden.

**[0009]** Die mehrfache Ausrichtung der Sequenzen in der katalytischen Domain von Proteinkinasen und folglich die Sparsamkeitsanalyse ermöglicht die Trennung von verwandten Kinasen in unterschiedliche Zweige oder Unterfamilien, die beinhalten: Tyrosinkinasen, cyclische, nukleotidabhängige Kinasen, Calcium/Kalmodulininkinasen, cyclische abhängige Kinasen und MAP-Kinasen, Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren und mehrere andere wenige definierte Unterfamilien.

### Zusammenfassung der Erfindung

**[0010]** Durch die Verwendung einer zielgerichteten PCR Klonierungsstrategie und eines „Motivextraktions“-Bioinformationsskriptes, sind Säugetiermitglieder der STE20-Kinase-Familie als Teil der vorliegenden Erfindung identifiziert worden. Die mehrfache Ausrichtung und Sparsamkeitsanalyse der katalytischen Domain all dieser STE20-Familienmitglieder zeigen, dass diese Proteincuster in 9 unterschiedliche Untergruppen auf-

geteilt werden können. Eine Klassifikation auf diese Art und Weise hat sich als sehr genau herausgestellt, nicht nur bei der Vorhersage von Motiven, die in dem restlichen nichtkatalytischen Teil jedes Proteins vorliegen, sondern ebenfalls bei ihrer Regulierung, ihrer Substrate und Signalwege. Die vorliegende Erfindung beinhaltet die teilweise oder vollständige Sequenz eines neuen Mitglieds der STE20-Familie, dessen Klassifikation, die vorhersagbare oder ableitbare Proteinstruktur und eine Strategie zur Aufklärung dessen biologischer und therapeutischer Relevanz.

**[0011]** Somit betrifft ein erster Aspekt der Erfindung ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes Nukleinsäuremolekül, das für STLK2 kodiert.

**[0012]** Mit „isoliert“ in Bezug auf Nukleinsäure ist ein Polymer von Nukleotiden, die zueinander konjugiert sind, einschließlich DNA und RNA, die aus einer natürlichen Quelle isoliert ist oder die synthetisiert ist, gemeint. Die isolierte Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung ist einzigartig in dem Sinn, dass sie nicht in einem reinen oder getrennten Zustand in der Natur zu finden ist. Die Verwendung des Begriffs „isoliert“ weist darauf hin, dass eine natürlich auftretende Sequenz aus ihrer normalen zellulären (d.h. chromosomal) Umgebung entfernt worden ist. Somit kann die Sequenz in einer zellfreien Lösung sein oder in einer unterschiedlichen zellulären Umgebung platziert werden. Der Begriff beinhaltet nicht, dass die Sequenz die einzige vorliegende Nukleotidkette ist, sondern dass sie ist im wesentlichen frei (ungefähr wenigstens 90-95% Reinheit) von Nicht-nukleotid-Material, das normalerweise damit verbunden ist, ist und somit von isolierten Chromosomen unterschieden wird.

**[0013]** Durch die Verwendung des Begriffs „angereichert“ in Bezug auf die Nukleinsäure ist gemeint, dass die spezifische DNA- oder RNA-Sequenz eine wesentlich höhere Fraktion (2-5-fach) der Gesamt-DNA oder RNA, die in den Zellen oder der Lösung von Interesse vorliegt, als in normalen oder erkrankten Zellen oder in den Zellen, aus denen die Sequenz entnommen wurde, bildet. Dies kann durch eine Person durch bevorzugte Verringerung in der Menge anderer vorliegender DNA oder RNA oder durch einen bevorzugten Anstieg in der Menge der spezifischen DNA- oder RNA-Sequenz oder durch eine Kombination von beiden verursacht werden. Es sollte jedoch angemerkt sein, dass angereichert nicht beinhaltet, dass dort keine anderen DNA- oder RNA-Sequenzen vorliegen, sondern dass die relative Menge der Sequenz von Interesse signifikant gesteigert wurde. Der Begriff „signifikant“ wird verwendet, um aufzuzeigen, dass das Niveau des Anstiegs für die Person, die einen solchen Anstieg durchmacht, verwendbar ist und bedeutet im allgemeinen einen relativen Anstieg gegenüber anderen Nukleinsäuren, um ungefähr wenigstens das 2-fache, bevorzugter wenigstens das 5- bis 10-fache oder sogar mehr. Der Begriff beinhaltet ebenfalls nicht, dass es keine DNA oder RNA aus anderen Quellen gibt. Die andere DNA-Quelle kann z.B. DNA aus einer Hefe oder einem bakteriellen Genom oder einem Klonierungsvektor, wie z.B. pUC19, umfassen. Dieser Begriff unterscheidet zwischen natürlich auftretenden Wirkungen, wie z.B. viraler Infektion, oder tumorartigem Wachstum, bei dem das Niveau einer mRNA auf natürliche Weise bezogen auf die andere Spezies der mRNA gesteigert sein kann. Das heißt, der Begriff soll nur diejenigen Situationen abdecken, bei denen eine Person interveniert hat, um den Teil der gewünschten Nukleinsäure zu erhöhen.

**[0014]** Es ist für einige Zwecke ebenso vorteilhaft, dass eine Nukleotidsequenz in ihrer gereinigten Form vorliegt. Der Begriff „gereinigt“ in Bezug auf die Nukleinsäure erfordert keine absolute Reinheit (wie z.B. eine homogene Zubereitung). Stattdessen repräsentiert er einen Hinweis, dass die Sequenz relativ gereinigt ist, als in der natürlichen Umgebung (verglichen zu dem natürlichen Niveau sollte dieses Niveau wenigstens 2-5-fach größer sein, z.B. in Bezug auf mg/ml). Einzelne aus einer cDNA-Bibliothek isolierte Klone können zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Die beanspruchten DNA-Moleküle, die aus diesen Klonen erhalten werden, können direkt aus Gesamt-DNA oder aus Gesamt-RNA erhalten werden. Die cDNA-Klonen treten nicht natürlich auf, sondern werden eher bevorzugt über Manipulation einer teilweise gereinigten natürlich auftretenden Sequenz (messenger RNA) erhalten. Die Konstruktion einer cDNA-Bibliothek aus mRNA beinhaltet die Bildung einer synthetischen Substanz (cDNA) und reine einzelne cDNA-Klonen können aus der synthetischen Bibliothek durch klonale Selektion der Zellen, die die cDNA-Bibliothek tragen, isoliert werden. Somit erzielt das Verfahren, das die Bildung einer cDNA-Bibliothek aus mRNA und die Isolierung unterschiedlicher cDNA-Klonen beinhaltet, eine ungefähr  $10^6$ -fache Reinigung der natürlichen Botschaft. Somit ist die Reinheit von wenigstens einer Größenordnung, bevorzugt zwei oder drei Größenordnungen und am bevorzugtesten vier oder fünf Größenordnungen ausdrücklich beabsichtigt.

**[0015]** Mit einem „Kinase-Polypeptid“ sind 32 (bevorzugt 40, bevorzugter 45, am bevorzugtesten 55) oder mehr aufeinanderfolgende Aminosäuren, die in der Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 oder der entsprechenden Aminosäuresequenz voller Länge gezeigt sind, gemeint. Bei bestimmten Aspekten sind Polypeptide mit 100, 200, 300 oder mehr Aminosäuren bevorzugt. Das Kinase-Polypeptid kann durch eine Nukleinsäuresequenz von vollständiger Länge oder irgendein Teil der Nukleinsäuresequenz von vollständiger Länge kodiert

sein, solange eine funktionale Aktivität des Polypeptids aufrechterhalten wird.

**[0016]** Die Aminosäuresequenz wird im wesentlichen der in SEQ ID Nr. 2 oder der korrespondierenden Aminosäuresequenz von vollständiger Länge oder von Fragmenten davon ähnlich sein. Eine Sequenz, die im Wesentlichen der Sequenz von SEQ ID Nr. 2 ähnlich ist, wird bevorzugt wenigstens 90% Identität (bevorzugter wenigstens 95% und am bevorzugtesten 99-100%) zu der Sequenz von SEQ ID Nr. 2 haben.

**[0017]** Mit „Identität“ ist eine Reinheit der Sequenzen gemeint, die ihre Ähnlichkeit oder ihre Beziehung bestimmt. Identität wird durch Teilen der Anzahl von identischen Resten durch die Gesamtzahl der Reste und Lücken und Multiplizieren des Produktes mit 100 gemessen. „Lücken“ sind Zwischenräume in einer Anordnung, die das Ergebnis der Additionen oder Entfernungen von Aminosäuren sind. Somit haben zwei Kopien von exakt der gleichen Sequenz 100% Identität, aber Sequenzen, die weniger stark erhalten sind und Löschungen, Hinzufügungen oder Ersetzungen haben, können einen niedrigeren Grad an Identität haben. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass mehrere Computerprogramme zur Bestimmung der Sequenzidentität erhältlich sind, die Standardparameter, z.B. Blast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402), Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. mol. biol. 215:403-410), und Smith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147:195- 197) verwenden.

**[0018]** In bevorzugten Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte, angereicherte oder gereinigte Nukleinsäuremoleküle, die für ein Kinase-Polypeptid kodieren, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die: (a) für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 2 gezeigt ist, kodiert; (b) das Komplement der Nukleotidsequenz von (a) ist; (c) unter sehr strengen Bedingungen an das Nukleotidmolekül von (a) hybridisiert und für ein natürlich auftretendes Kinase-Polypeptid kodiert; (d) für ein Kinase-Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 kodiert, mit der Ausnahme, dass diesem eine oder mehrere, aber nicht alle, der folgenden Segmente der Aminosäurereste fehlen: 1-21, 22-274 oder 275-416 der SEQ ID Nr. 2; (e) das Komplement der Nukleotidsequenz von (d) ist; (f) für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr. 2 gezeigt ist, von Aminosäureresten 1-21, 22-274 oder 275-416 der SEQ ID Nr. 2 kodiert; (g) das Komplement der Nukleotidsequenz von (f) ist; (h) für ein Polypeptid mit der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert, mit der Ausnahme, dass diesem eine oder mehrere der Domains, die aus der Gruppe, die aus einer N-endständigen Domain, einer katalytischen Domain, einer C-endständigen Domain, einer aufgewickelten Spiralenstrukturregion, einer Prolin-reiche Region, einer Spacer-Region, einem Einschub und einem C-endständigen Schwanz besteht, ausgewählt werden, fehlen oder (i) das Komplement der Nukleotidsequenz von (h) ist.

**[0019]** Der Begriff „Komplement“ betrifft zwei Nukleotide, die mehrere vorteilhafte Wechselwirkungen miteinander bilden können. Zum Beispiel ist Adenin komplementär zu Thymin, da sie zwei Wasserstoffbindungen bilden können. Auf gleiche Weise sind Guanin und Cytosin komplementär, da sie drei Wasserstoffbindungen bilden können. Eine Nukleotidsequenz ist das Komplement einer anderen Nukleotidsequenz, wenn all die Nukleotide der ersten Sequenz komplementär zu all den Nukleotiden der zweiten Sequenz sind.

**[0020]** Der Begriff „Domain“ betrifft eine Region eines Polypeptids, die eine spezielle Funktion enthält. Zum Beispiel können N-endständige oder C-endständige Domains von Signalübertragungsproteinen Funktionen dienen, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, Moleküle binden, die das Signalübertragungsmolekül in unterschiedlichen Regionen der Zelle lokalisieren oder andere Signalmoleküle, die direkt für die Propagation eines speziellen zellulären Signals verantwortlich sind, binden. Einige Domains können getrennt von dem Rest des Proteins exprimiert werden und funktionieren von selbst, während andere ein Teil des intakten Proteins bleiben müssen, um ihre Funktion zu behalten. Die letztgenannten werden als funktionale Regionen der Proteine bezeichnet und betreffen ebenfalls die Domains.

**[0021]** Der Begriff „N-endständige Domain“ betrifft die extrakatalytische Region, die sich zwischen dem Initiator Methionin und der katalytischen Domain der Proteinkinase befindet. Die N-endständige Domain kann durch Befolgerung einer Smith-Waterman Ausrichtung der Proteinsequenz gegenüber der überflüssigen Proteindatenbasis identifiziert werden, um die N-endständige Grenze der katalytischen Domain zu definieren. Abhängig von dessen Länge kann die N-endständige Domain eine regulatorische Rolle bei der Kinasefunktion spielen oder nicht. Ein Beispiel einer Proteinkinase, deren N-endständige Domain gezeigt hat, dass sie eine regulatorische Rolle spielt, ist PAK65, die ein CRIB-Motiv, das für Cdc42 und rac-Bindung verwendet wird, enthält (Burbelo, P.D. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 29071-290740).

**[0022]** Die N-endständige Domain überspannt die Aminosäurereste 1-21 der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Sequenz.

**[0023]** Der Begriff „katalytische Domain“ betrifft eine Region der Proteinkinase, die typischerweise 25-300 Aminosäuren lang ist und für die Ausführung der Phosphattransferreaktion von einem Hochenergiephosphat-Donormolekül, wie z.B. ATP oder GTP, an sich selbst (Autophosphorylierung) oder an andere Proteine (exogene Phosphorylierung) verantwortlich ist. Die katalytische Domain von Proteinkinasen ist aus 12 Subdomains zusammengesetzt, die stark erhaltene Aminosäurereste enthalten, und für saubere Polypeptidfaltung und die Katalyse verantwortlich sind. Die katalytische Domain kann durch Befolgerung einer Smith-Waterman Ausrichtung der Proteinsequenz gegenüber der nichtredundanten Proteindatenbasis identifiziert werden.

**[0024]** Die katalytische Domain überspannt die Aminosäurereste 22-274 der in SEQ ID Nr.2 gezeigten Sequenz.

**[0025]** Der Begriff „katalytische Aktivität“, wie er hier verwendet wird, definiert die Geschwindigkeit, mit der eine Kinase katalytische Domain ein Substrat phosphoryliert. Katalytische Aktivität kann z.B. durch Bestimmen der Menge eines Substrates, das in ein phosphoryliertes Produkt umgewandelt wurde, als eine Funktion der Zeit gemessen werden. Katalytische Aktivität kann durch Verfahren der Erfindung gemessen werden, in dem die Zeit konstant gehalten wird und die Konzentration eines phosphorylierten Substrats nach einem fixierten Zeitraum bestimmt wird. Phosphorylierung eines Substrats tritt an der aktiven Stelle einer Proteinkinase auf. Die aktive Stelle ist normalerweise ein Hohlraum, in dem das Substrat an die Proteinkinase bindet und phosphoryliert wird.

**[0026]** Der Begriff „Substrat“, wie er hier verwendet wird, betrifft ein Molekül, das durch eine Kinase der Erfindung phosphoryliert ist. Kinasen phosphorylieren Substrate an Serin/Threonin oder Tyrosin-Aminosäuren. Das Molekül kann ein anderes Protein oder ein Polypeptid sein.

**[0027]** Der Begriff „C-endständige Domain“ betrifft die Region, die sich zwischen der katalytischen Domain oder der letzten (befindet sich am nächsten zu dem C-Ende) funktionellen Domain und dem Carboxy-endständigem Aminosäurerest der Proteinkinase befindet. Mit „funktioneller“ Domain ist irgendeine Region des Polypeptids gemeint, die eine regulatorische oder katalytische Rolle wie durch Aminosäuresequenzhomologie an andere Proteine vorhergesagt oder durch das Vorhandensein der Aminosäuresequenzen, die für spezifische strukturelle Konformationen (d.h. aufgewickelte Spule) Hinweis geben, gemeint. Die C-endständige Domain kann unter Verwendung einer Smith-Waterman-Ausrichtung der Proteinsequenz gegenüber der nicht-redundanten Proteindatenbasis identifiziert werden, um die C-endständige Grenze der katalytischen Domain oder irgendeiner funktionalen C-endständigen extrakatalytischen Domain zu definieren. Abhängig von ihrer Länge und Aminosäurezusammensetzung kann die C-endständige Domain eine regulatorische Rolle bei der Kinasefunktion spielen oder nicht. Ein Beispiel einer Proteinkinase, deren C-terminales Ende eine regulatorische Rolle spielt, ist PAK3, das eine heterotrimerisches G<sub>b</sub> Subunit-Bindungsseite in Nähe ihres C-Endes enthält (Leeuw, T. et al (1998) Nature, 391, 191-195).

**[0028]** Das C-endständige Ende überspannt die Aminosäurereste 275-416 der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Sequenz.

**[0029]** Der Begriff „Signalübertragungsweg“ betrifft Moleküle, die ein extrazelluläres Signal durch die Zellmembran verbreiten, um ein intrazelluläres Signal zu werden. Dieses Signal kann eine zelluläre Antwort stimulieren. Die Polypeptidmoleküle, die bei Signalübertragungsprozessen involviert sind, sind typischerweise Rezeptor- und Nichtrezeptorprotein-Tyrosinkinasen, Rezeptor- und Nichtrezeptor-Protein-Phosphatasen, SRC homologe 2 und 3 Domains, Phosphotyrosin-Bindungsproteine (SRC Homologie 2 (SH2) und Phosphotyrosinbindungs-(PTP und PH) Domain, die Proteine enthält), Prolin-reiche Bindungsproteine (SH3 Domänenhaltige Proteine), Nukleotidaustauschfaktoren und Transkriptionsfaktoren.

**[0030]** Verschiedene niedrig- oder hochstringente Hybridisierungsbedingungen können verwendet werden, abhängig von der gewünschten Spezifität und Selektivität. Diese Bedingungen sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt. Unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisieren nur hoch komplementäre Nukleinsäuresequenzen. Bevorzugt verhindern diese Bedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren mit mehr als 1 oder 2 Fehlstellen von 20 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, bevorzugter verhindern die Bedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren mit mehr als 1 oder 2 Fehlstellen von 50 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, am bevorzugtesten verhindern diese Bedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren mit mehr als 1 oder 2 Fehlstellen von 100 aufeinanderfolgenden Nukleotiden. Bei einigen Beispielen können die Bedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren mit mehr als 5 Fehlstellen in der Sequenz mit vollständiger Länge verhindern.

**[0031]** Mit stringenten Hybridisierungsassaybedingungen sind Hybridisierungsassaybedingungen gemeint, die wenigstens so stringent wie das folgende sind: Hybridisierung in 50% Formamid, 5X SSC, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml mit ultraschallbehandelter Lachssperma-DNA und 5X Denhart-Lösung bei 42°C über Nacht; Waschen mit 0.2X SSC, 0.1% SDS bei 45°C und Waschen mit 0.2X SSC, 0.1% SDS bei 45°C. Bei einigen der stringesten Hybridisierungsassay-Bedingungen kann die zweite Waschung mit 0.1X SSC bei einer Temperatur bis zu 70°C durchgeführt werden (Berger et al. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Seite 421, hier als Referenz eingefügt, einschließlich jeder Figuren, Tabellen oder Zeichnungen). Andere Anwendungen können jedoch die Verwendung von Bedingungen, die zwischen diese Bedingungssets fallen, erfordern. Verfahren zur Bestimmung der Bedingungen, die benötigt werden, um die gewünschten Hybridisierungen zu erreichen, sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt und basieren auf verschiedenen Faktoren, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, den Sequenzen, die hybridisiert werden sollen, und den Proben, die getestet werden sollen.

**[0032]** Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte, angereicherte oder gereinigte Nukleinsäuremoleküle, die für das Kinase-Polypeptid kodieren, wobei sie weiter einen Vektor oder einen Promoter umfassen, der die Transkription in einer Wirtszelle wirksam startet. Die Erfindung betrifft ebenfalls eine rekombinante Nukleinsäure, bevorzugt in einer Zelle oder einem Organismus. Die rekombinante Nukleinsäure kann eine Sequenz, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, oder ein funktionelles Derivat davon und einen Vektor oder einen Promoter, der die Transkription in einer Wirtszelle wirksam startet, enthalten. Die rekombinante Nukleinsäure kann alternativ eine transkriptionale Startregion enthalten, die in einer Zelle funktional ist, eine Sequenz, die einer RNA-Sequenz komplementär ist, die für ein Kinase-Polypeptid kodiert und eine transkriptionale Endregion, die in einer Zelle funktional ist. Spezifische Vektoren und Wirtszellkombinationen werden hier diskutiert.

**[0033]** Der Begriff „Vektor“ betrifft ein einfaches oder doppelverdrehtes zirkuläres Nukleinsäuremolekül, das in Zellen transfiziert werden kann und innerhalb oder unabhängig von einem Zellgenom repliziert werden kann. Ein zirkuläres doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül kann geschnitten werden und dabei durch Behandlung mit Restriktionsenzymen linearisiert werden. Eine Auswahl von Nukleinsäurevektoren, Restriktionsenzymen und die Kenntnis der Nukleotidsequenzen, die von Restriktionsenzymen geschnitten werden, sind leicht vom Durchschnittsfachmann erhältlich. Ein Nukleinsäuremolekül, das für eine Kinase kodiert, kann in einen Vektor durch Schneiden des Vektors mit Restriktionsenzymen und Binden der beiden Teile zusammen eingeführt werden.

**[0034]** Der Begriff „transfizieren“ definiert eine Anzahl von Verfahren, die einen Nukleinsäurevektor oder andere Nukleinsäuremoleküle in einen zellulären Organismus einführen. Diese Verfahren schließen eine Vielzahl von Techniken ein, wie z.B. die Behandlung der Zellen mit Salz hoher Konzentration, einem elektrischen Feld, Detergenzien oder DMSO, um die äußere Membran oder die Zellwand gegenüber Nukleinsäuremolekülen von Interesse durchlässig zu machen, oder die Verwendung von verschiedenen viralen Transduktionsstrategien.

**[0035]** Der Begriff „Promoter“, wie er hier verwendet wird, betrifft eine Nukleinsäuresequenz, die für Gensequenzexprimierung benötigt wird. Die Promoter-Regionen variieren von Organismus zu Organismus, sind aber für unterschiedliche Organismen dem Durchschnittsfachmann gut bekannt. Zum Beispiel enthält in Prokaryoten die Promoter-Region sowohl den Promoter (welcher den Start der RNA-Transkription lenkt) als auch die DNA-Sequenz, welche, wenn sie in die RNA transkribiert wird, den Synthesebeginn signalisiert. Diese Regionen werden normalerweise die 5'-nicht-kodierenden Sequenzen beinhalten, die mit dem Start der Transkription und Translation involviert sind, wie z.B. die TATA Box, Kappsequenz, CAAT-Sequenz und ähnliches.

**[0036]** In bevorzugten Ausführungsformen umfasst die isolierte Nukleinsäure, besteht im wesentlichen aus oder besteht aus einer in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Nukleinsäuresequenz oder der korrespondierenden Sequenz mit voller Länge, wobei sie für die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 oder die korrespondierende Aminosäuresequenz mit ganzer Länge, ein funktionales Derivat davon oder wenigstens 40, 45, 50, 60, 100, 200 oder 300 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr. 2 oder der korrespondierenden Aminosäuresequenz ganzer Länge kodiert. Das Kinase-Polypeptid STLK2 umfasst, besteht im wesentlichen aus oder besteht aus wenigstens 40, 45, 50, 60, 100, 200 oder 300 aufeinanderfolgenden Aminosäuren der SEQ ID Nr. 2 oder der korrespondierenden Sequenz ganzer Länge oder aus Derivaten davon. Die Nukleinsäure kann aus einer natürlichen Quelle durch cDNA-Klonen oder durch subtraktive Hybridisierung isoliert werden. Die natürliche Quelle kann ein Säugetier, bevorzugt ein Mensch, Blut, Samenflüssigkeit oder Gewebe sein und die Nukleinsäure kann durch das Triesterverfahren oder unter Verwendung eines automatisierten DNA-Synthetisierers synthetisiert werden.

**[0037]** Der Begriff „Säugetier“ betrifft bevorzugt Organismen, wie z.B. Mäuse, Ratten, Kaninchen, Guineaschweine, Schafe und Ziegen, bevorzugter Katzen, Hunde, Affen und Menschenaffen und am bevorzugtesten Menschen.

**[0038]** In noch anderen bevorzugten Ausführungsformen ist die Nukleinsäure eine konservierte oder einzigartige Region, z.B. die nützlich ist für: das Design der Hybrisierungssonde, um die Identifizierung und das Klonen zusätzlicher Polypeptide zu erleichtern, das Design von PCR-Sonden, um das Klonieren von zusätzlichen Polypeptiden zu erleichtern, Antikörper aus Polypeptidregionen zu erhalten und Antisense Oligonukleotide zu entwerfen.

**[0039]** Mit „konservierten Nukleinsäureregionen“ sind Regionen gemeint, die auf zwei oder mehr Nukleinsäuren vorliegen, die für ein Kinase-Polypeptid kodieren, an welches eine bestimmte Nukleinsäuresequenz unter weniger strengen Bedingungen hybridisieren kann. Beispiele für weniger strenge Bedingungen, die für das Screening von Nukleinsäure, die für Kinase-Polypeptide kodiert, geeignet sind, sind bei Abe, et al. (J. Biol. Chem. 19:13361-13368, 1992) bereitgestellt, wobei es hier in dessen Gänze als Bezug eingefügt ist, einschließlich jeder Zeichnungen, Figuren oder Tabellen. Bevorzugt unterscheiden sich konservierte Regionen um nicht mehr als 5 von 20 Nukleotiden, noch bevorzugter 2 von 20 Nukleotiden und am bevorzugtesten 1 von 20 Nukleotiden.

**[0040]** Mit „einzelne Nukleinsäureregion“ ist eine Sequenz gemeint, die in einer Nukleinsäure, die für ein Kinase-Polypeptid kodiert, das nicht in einer Sequenz, die für irgendein anderes natürlich auftretendes Polypeptid kodiert, vorliegt. Diese Regionen kodieren bevorzugt für 32 (bevorzugt 40, bevorzugter 45, am bevorzugtesten 55) oder mehr aufeinanderfolgende in der Aminosäuresequenz, die in der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.2 oder der korrespondierenden Aminosäuresequenz ganzer Länge oder funktionalen Derivaten davon gezeigt sind. Insbesondere ist eine einzige Nukleinsäureregion bevorzugt vom Ursprung eines Säugetiers.

**[0041]** Ein zweiter Aspekt der Erfindung betrifft eine Nukleinsäuresonde für die Bestimmung der Nukleinsäure, die für ein Kinase-Polypeptid in einer Probe kodiert, wobei das Polypeptid STLK2 ist. Bevorzugt kodiert die Nukleinsäuresonde für ein Kinase-Polypeptid, das ein Fragment des Proteins ist, das für die Aminosäuresequenz, die in SEQ ID Nr.2 gezeigt ist, oder die korrespondierende Aminosäuresequenz ganzer Länge kodiert. Die Nukleinsäuresonde enthält eine Nukleotidbasissequenz, die an die Sequenz, die in SEQ ID Nr.1 gezeigt ist, oder die korrespondierende Sequenz ganzer Länge oder ein funktionales Derivat davon hybridisieren wird.

**[0042]** In bevorzugten Ausführungsformen hybridisiert die Nukleinsäuresonde an Nukleinsäure, die wenigstens für 6, 12, 75, 90, 105, 120, 150, 200, 250, 300 oder 350 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID Nr.2 gezeigten Sequenz oder der korrespondierenden Aminosäuresequenz ganzer Länge oder funktionaler Derivate davon kodiert.

**[0043]** Verfahren für die Verwendung der Sonden beinhalten die Bestimmung des Vorhandenseins oder die Menge von Kinase-RNA in einer Probe durch In-Kontakt-Bringen der Probe mit einer Nukleinsäuresonde unter Bedingungen, so dass die Hybridisierung auftritt und durch Bestimmen des Vorhandenseins oder der Menge der Sonde, die an die Kinase-RNA gebunden ist. Die Nukleinsäure Duplex, die zwischen der Sonde und einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Kinase-Polypeptid kodiert, gebildet wird, kann bei der Identifizierung der Sequenz der detektierten Nukleinsäure verwendet werden (Nelson et al., in Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, Kricka, ed., S. 275, 1992, hier als Referenz vollständig eingefügt, einschließlich jeder Zeichnungen, Figuren oder Tabellen). Kits zur Durchführung dieser Verfahren können konstruiert werden, um Behältermittel mit einer darin enthaltenen Nukleinsäuresonde zu enthalten.

**[0044]** In einem dritten Aspekt beschreibt die Erfindung eine rekombinante Zelle oder ein Gewebe, die ein Nukleinsäuremolekül umfassen, das für das Kinase-Polypeptid STLK2 kodiert. In diesen Zellen kann die Nukleinsäure unter der Kontrolle der genomischen regulatorischen Elemente sein oder kann unter der Kontrolle von exogenen regulatorischen Elementen sein, einschließlich einem exogenen Promoter. Mit „exogen“ ist ein Promoter gemeint, der nicht normal in vivo transkriptional an die kodierende Sequenz für die Kinase-Polypeptide gekoppelt ist.

**[0045]** Das Polypeptid ist bevorzugt ein Fragment des Proteins, das für die in SEQ ID Nr. 2 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert. Mit „Fragment“ ist eine Aminosäuresequenz gemeint, die in einem Kinase-Polypeptid vorliegt. Bevorzugt umfasst eine solche Sequenz wenigstens 32, 45, 50, 60, 100, 200 oder 300 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr. 2 oder der korrespondierenden Aminosäuresequenz ganzer Länge oder eines funktionalen Derivates davon.

**[0046]** In einem vierten Aspekt betrifft die Erfindung das isolierte, angereicherte oder gereinigte Kinase-Polypeptid STLK2.

**[0047]** Mit „isoliert“ in Bezug auf ein Polypeptid ist ein Polymer von Aminosäuren (2 oder mehr Aminosäuren) gemeint, die aneinander konjugiert sind, einschließlich Polypeptide, die aus einer natürlichen Quelle isoliert werden oder die synthetisiert sind. Die isolierten Polypeptide der vorliegenden Erfindung sind in dem Sinne einmalig, dass sie nicht in einem reinen oder getrennten Zustand in der Natur gefunden werden. Die Verwendung des Begriffs „isoliert“ zeigt, dass eine natürlich auftretende Sequenz aus ihrer normalen zellulären Umgebung entfernt wurde. Somit kann die Sequenz in einer zellenfreien Lösung sein oder in eine unterschiedliche zelluläre Umgebung platziert werden. Der Begriff beinhaltet nicht, dass die Sequenz die einzige Aminosäurekette ist die vorliegt, sondern das sie im wesentlichen frei (ungefähr 90-95% Reinheit wenigstens) von Nichtaminosäurematerial, das natürlicherweise damit verbunden ist, ist.

**[0048]** Durch die Verwendung des Begriffs „angereichert“ in Bezug auf ein Polypeptid ist gemeint, dass die spezifische Aminosäuresequenz eine signifikant höhere Fraktion (2-5-fach) der Gesamtaminosäuresequenzen, die in den Zellen oder der Lösung von Interesse vorliegen, als in normalen oder erkrankten Zellen oder in den Zellen, aus welchen die Sequenz entnommen wurde, darstellt. Dies kann durch eine Person durch bevorzugte Reduktion in der Menge anderer vorliegender Aminosäuresequenzen oder durch einen bevorzugten Anstieg in der Menge der spezifischen Aminosäuresequenz von Interesse oder durch eine Kombination der beiden verursacht werden. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass „angereichert“ nicht beinhaltet, dass keine anderen Aminosäuresequenzen vorliegen, sondern dass die relative Menge der Sequenz von Interesse signifikant erhöht wurde. Der Begriff signifikant wird hier verwendet, um aufzuzeigen, dass das Niveau des Anstiegs für die Person, die einen solchen Anstieg durchmacht, verwendbar ist und bedeutet im allgemeinen einen Anstieg relativ zu anderen Aminosäuresequenzen um ungefähr wenigstens das 2-fache, bevorzugter wenigstens das 5- bis 10-fache oder sogar mehr. Der Begriff beinhaltet ebenfalls nicht, dass es keine Aminosäuresequenzen aus anderen Quellen gibt. Die andere Quelle für Aminosäuresequenzen kann z.B. eine Aminosäuresequenz umfassen, die für eine Hefe oder ein bakterielles Genom oder einen Klonierungsvektor, wie z.B. pUC19, kodiert. Der Begriff soll nur diese Situationen, bei denen man eingegriffen hat, um den Anteil der gewünschten Aminosäuresequenz zu erhöhen, abdecken.

**[0049]** Es ist ebenfalls vorteilhaft für einige Zwecke, dass eine Aminosäuresequenz in gereinigter Form ist. Der Begriff „gereinigt“ in Bezug auf ein Polypeptid erfordert keine absolute Reinheit (wie eine homogene Zubereitung); stattdessen repräsentiert er einen Hinweis, dass die Sequenz relativ reiner ist als in der natürlichen Umgebung. Verglichen mit dem natürlichen Niveau sollte dieses Niveau um wenigstens das 2-5-fache größer sein (z.B. bezüglich mg/ml). Reinheit von wenigstens einer Größenordnung, bevorzugt zwei oder drei Größenordnungen und bevorzugter vier oder fünf Größenordnungen ist ausdrücklich beabsichtigt. Die Substanz ist bevorzugt frei von Kontamination bei einem funktionalen signifikanten Niveau, z.B. 90%, 95% oder 99% Reinheit.

**[0050]** In bevorzugten Ausführungsformen ist das Kinase-Polypeptid ein Fragment des Proteins, das für die Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 oder die korrespondierenden Aminosäuresequenzen ganzer Länge kodiert. Bevorzugt enthält das Kinase-Polypeptid wenigstens 32, 45, 50, 60, 100, 200 oder 300 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr. 2 oder der korrespondierenden Aminosäuresequenz ganzer Länge oder eines funktionalen Derivates davon.

**[0051]** In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Kinase-Polypeptid eine Aminosäuresequenz mit (a) der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz; (b) der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz, mit der Ausnahme, dass ihr eine oder mehrere, aber nicht alle, der folgenden Segmente der Aminosäurereste fehlen: 1-21, 22-274 oder 275-416 der SEQ ID Nr. 2; (c) der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz der Aminosäurereste 1-21, 22-274 oder 275-416 der SEQ ID Nr. 2; (d) der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz, mit der Ausnahme, dass ihr eine oder mehrere, aber nicht alle, der Domains, die aus der Gruppe, die aus einer C-endständigen Domain, einer katalytischen Domain und einer N-endständigen Domain besteht, ausgewählt werden, fehlen.

**[0052]** Das Polypeptid kann aus einer natürlichen Quelle durch im Stand der Technik gut bekannte Verfahren isoliert werden. Die natürliche Quelle kann ein Säugetier, bevorzugt ein Mensch, Blut, Samenflüssigkeit oder Gewebe sein und das Polypeptid kann unter Verwendung eines automatisierten Polypeptid-Synthetisierers synthetisiert werden. Das isolierte, angereicherte oder gereinigte Kinase-Polypeptid ist bevorzugt: ein STLK2 Polypeptid.

**[0053]** In einigen Ausführungsformen beinhaltet die Erfindung das rekombinante Kinase-Polypeptid STLK2.

Mit „rekombinantes Kinase-Polypeptid“ ist ein Polypeptid gemeint, das durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt wird, so dass es sich von einem natürlich auftretenden Polypeptid entweder in seinem Standort (z.B. in einer unterschiedlichen Zelle oder Gewebe vorliegend, anstatt in der Natur vorgefunden), Reinheit oder Struktur unterscheidet. Im allgemeinen wird ein solches rekombinantes Polypeptid in einer Zelle in einer Menge vorliegen, die sich von der normal in der Natur beobachteten unterscheiden wird.

**[0054]** In einem fünften Aspekt betrifft die Erfindung einen Antikörper (z.B. einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper) mit spezifischer Bindungsaffinität an ein Kinase-Polypeptid oder eine Kinase-Polypeptiddomain oder -fragment, wobei das Polypeptid STLK2 ist. Mit „spezifische Bindungsaffinität“ ist gemeint, dass der Antikörper an das Target-Kinase-Polypeptid mit größerer Affinität bindet als es an andere Polypeptide unter speziellen Bedingungen bindet. Antikörper oder Antikörperfragmente sind Polypeptide, die Regionen enthalten, die an andere Polypeptide binden können. Der Begriff „spezifische Bindungsaffinität“ beschreibt einen Antikörper, der an ein Kinase-Polypeptid mit größerer Affinität bindet, als er an andere Polypeptide unter speziellen Bedingungen bindet.

**[0055]** Der Begriff „polyklonal“ betrifft Antikörper, die heterogene Populationen von Antikörpermolekülen sind, die sich aus den Seren von Tieren, die mit einem Antigen oder einem antigenen funktionalen Derivat davon immunisiert sind, ableiten. Für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern können verschiedene Wirtstiere durch Injektion mit dem Antigen immunisiert werden. Verschiedene Hilfsstoffe können verwendet werden, um die immunologische Antwort zu steigern, abhängig von den Wirtsspezies.

**[0056]** „Monoklonale Antikörper“ sind im wesentlichen homogene Populationen von Antikörpern auf ein spezielles Antigen. Sie können durch irgendeine Technik erhalten werden, die die Herstellung von Antikörpermolekülen durch kontinuierliche Zelllinien in Kultur bereitstellen. Monoklonale Antikörper können durch den Durchschnittsfachmann bekannte Verfahren erhalten werden (Kohler et al., Nature 256:495-497, 1975 und U.S. Patent Nr. 4,376,110, wobei beide hier als Referenz vollständig eingefügt sind, einschließlich jeder Figuren, Tabellen oder Zeichnungen).

**[0057]** Der Begriff „Antikörperfragment“ betrifft einen Teil eines Antikörpers, oftmals die hypervariable Region und Teile der umgebenden schweren und leichten Ketten, die spezifische Bindungsaffinität für ein bestimmtes Molekül zeigt. Eine hypervariable Region ist ein Teil eines Antikörpers, der physikalisch an das Polypeptidtarget bindet.

**[0058]** Antikörper oder Antikörperfragmente mit spezifischer Bindungsaffinität an ein Kinase-Polypeptid der Erfindung können in Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins und/oder der Menge eines Kinase-Polypeptids in einer Probe, durch Erforschen der Probe mit dem Antikörper unter Bedingungen, die für die Kinase-Antikörper Immunokomplexbildung geeignet sind und durch Bestimmen des Vorhandenseins und/oder der Menge des Antikörpers, der an das Kinase-Polypeptid konjugiert ist, verwendet werden. Diagnostische Kits zur Durchführung dieser Verfahren können konstruiert werden, um Antikörper oder Antikörperfragmente, die für die Kinase spezifisch sind, als auch ein Konjugat von einem Bindungspartner der Antikörper oder der Antikörper selbst zu beinhalten.

**[0059]** Ein Antikörper oder Antikörperfragment mit spezifischer Bindungsaffinität an ein Kinase-Polypeptid der Erfindung kann aus einem prokaryotischen oder eukaryotischen Organismus isoliert, angereichert oder gereinigt sein. Routineverfahren, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind, ermöglichen die Herstellung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Organismen. Die Reinigung, Anreicherung und Isolierung von Antikörpern, die Polypeptidmoleküle sind, ist oben beschrieben.

**[0060]** Antikörper mit spezifischer Bindungsaffinität an ein Kinase-Polypeptid der Erfindung können bei Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins und/oder der Menge von Kinase-Polypeptid in einer Probe durch in Kontakt bringen der Probe mit dem Antikörper unter Bedingungen, so dass sich ein Immunokomplex bildet und zur Bestimmung des Vorhandenseins und/oder der Menge des Antikörpers, der mit dem Kinase-Polypeptid konjugiert ist, verwendet werden. Diagnostische Kits zur Durchführung dieser Verfahren können konstruiert werden, um einen ersten Behälter, der den Antikörper enthält, und einen zweiten Behälter mit einem Konjugat eines Bindungspartners des Antikörpers und einer Markierung, wie z.B. ein Radioisotop, zu beinhalten. Der diagnostische Kit kann ebenfalls die Mitteilung einer von der FDA akzeptierten Verwendung und Instruktionen davon beinhalten.

**[0061]** In einem sechsten Aspekt betrifft die Erfindung ein Hybridoma, das einen Antikörper mit spezifischer Bindungsaffinität an ein Kinase-Polypeptid oder eine Kinase-Polypeptiddomain erzeugt, wobei das Polypeptid

STLK2 ist. Mit „Hybridoma“ ist eine immortalisierte Zelllinie gemeint, die in der Lage ist, einen Antikörper zu sekretieren, z.B. einen Antikörper an eine Kinase der Erfindung. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst der Antikörper an die Kinase eine Sequenz von Aminosäuren, die spezifisch an ein Kinase-Polypeptid der Erfindung binden kann.

**[0062]** In einem siebten Aspekt betrifft die Erfindung einen Kinase-Polypeptid Bindungsagenten, der das Kinase-Polypeptid STLK2 binden kann. Der Bindungsagent ist bevorzugt ein gereinigter Antikörper, der ein Epitop, das auf dem Kinase-Polypeptid der Erfindung vorliegt, erkennt. Andere Bindungsagenten beinhalten Moleküle, die an Kinase-Polypeptide und analoge Moleküle, die an ein Kinase-Polypeptid binden, bindet. Diese Bindungsagenten können unter Verwendung von Assays, die die Kinase Bindungspartneraktivität messen, wie z.B. die, die die PDGFR Aktivität misst, identifiziert werden.

**[0063]** Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zum Screenen für menschliche Zellen, die ein Kinase-Polypeptid der Erfindung oder eine äquivalente Sequenz enthalten. Das Verfahren beinhaltet die Identifizierung des neuen Polypeptids in menschlichen Zellen unter Verwendung von Techniken, die im Stand der Technik Routine und Standard sind, wie z.B. die, die hier für die Identifizierung der Kinasen der Erfindung beschrieben sind (z.B. Klonieren, Southern or Northern Blot-Analyse, in situ Hybridisierung, PCR Amplifikation, etc.).

**[0064]** In einem achten Aspekt betrifft die Erfindung Verfahren zur Identifizierung einer Substanz, die Kinaseaktivität moduliert, wobei sie die Schritte umfassen: (a) In-Kontaktbringen des Kinase-Polypeptids STLK2 mit einer Testsubstanz; (b) Messen der Aktivität des Polypeptids und (c) Bestimmen, ob die Substanz die Aktivität des Polypeptids moduliert.

**[0065]** Der Begriff „modulieren“ betrifft die Fähigkeit einer Verbindung die Funktion einer Kinase der Erfindung zu verändern. Ein Modulator aktiviert oder inhibiert bevorzugt die Aktivität einer Kinase der Erfindung, abhängig von der Konzentration der Verbindung, die der Kinase ausgesetzt ist.

**[0066]** Der Begriff „aktivieren“ betrifft die Steigerung der zellulären Aktivität der Kinase. Der Begriff „Inhibieren“ betrifft das Verringern der zellulären Aktivität der Kinase. Kinase Aktivität ist bevorzugt die Wechselwirkung mit einem natürlichen Bindungspartner.

**[0067]** Der Begriff „modulieren“ betrifft ebenfalls die Veränderung der Funktion der Kinasen der Erfindung durch Erhöhen oder Erniedrigen der Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Komplex zwischen der Kinase und einem natürlichen Bindungspartner bildet. Ein Modulator erhöht bevorzugt die Wahrscheinlichkeit, dass sich dieser Komplex zwischen der Kinase und dem natürlichen Bindungspartner bildet, bevorzugter erhöht oder verringert die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Komplex zwischen der Kinase und dem natürlichen Bindungspartner bildet, abhängig von der Konzentration der Verbindung, die der Kinase ausgesetzt ist, und am bevorzugtesten verringert die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Komplex zwischen der Kinase und dem natürlichen Bindungspartner bildet.

**[0068]** Der Begriff „Komplex“ betrifft eine Anordnung von wenigstens zwei Molekülen, die aneinander gebunden sind.

**[0069]** Signalübertragungskomplexe enthalten oft wenigstens zwei Proteinmoleküle, die aneinander gebunden sind. Zum Beispiel binden sich eine Proteintyrosinrezeptor-Proteinkinase, GRB2, SOS, RAF und RAS zusammen, um einen Signalübertragungskomplex als Antwort auf einen mitogenen Liganden zu bilden.

**[0070]** Der Begriff „natürlicher Bindungspartner“ betrifft Polypeptide, Lipide, kleine Moleküle oder Nukleinsäuren, die an Kinasen in Zellen binden. Eine Veränderung in der Wechselwirkung zwischen einer Kinase und einem natürlichen Bindungspartner kann sich selbst als eine gesteigerte oder verringerte Wahrscheinlichkeit, das sich die Wechselwirkung bildet, oder als eine gesteigerte oder verringerte Konzentration des Kinase/natürlichen Bindungspartnerkomplexes manifestieren.

**[0071]** Der Begriff „in Kontakt bringen“, wie er hier verwendet wird, betrifft das Mischen einer Lösung, die die Testverbindung umfasst, mit einem flüssigen Medium, das die Zellen der Verfahren badet. Die Lösung, die die Verbindung umfasst, kann ebenso eine andere Komponente, wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), das die Aufnahme der Testverbindung oder Verbindungen in die Zellen der Verfahren erleichtert, umfassen. Die Lösung, die die Testverbindung umfasst, kann zu dem Medium, das die Zellen badet, durch Verwenden eines Abgabeapparats, wie z.B. ein auf einer Pipette basierendes Gerät oder auf einer Spritze basierendes Gerät, hinzugefügt werden.

**[0072]** In einem neunten Aspekt betrifft die Erfindung Verfahren zur Identifizierung einer Substanz, die Kinasaktivität in einer Zelle moduliert, wobei sie die Schritte umfassen: (a) Exprimieren eines Kinase-Polypeptids in einer Zelle, wobei das Polypeptid STLK2 ist; (b) Hinzufügen einer Testsubstanz zu der Zelle und (c) Kontrollieren einer Veränderung in dem Zellphenotyp oder der Wechselwirkung zwischen dem Polypeptid und einem natürlichen Bindungspartner.

**[0073]** Der Begriff „exprimieren“, wie er hier verwendet wird, betrifft die Herstellung von Kinasen der Erfindung aus einem Nukleinsäurevektor, der Kinasegene innerhalb einer Zelle enthält. Der Nukleinsäurevektor wird in Zellen unter Verwendung im Stand der Technik gut bekannter Techniken, wie hier beschrieben, eingeschleust.

**[0074]** In einem zehnten Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Behandlung einer Erkrankung durch Verabreichen einer Substanz, die die Aktivität der Kinase STLK2 moduliert, an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, bereit. Bevorzugt wird die Erkrankung aus der Gruppe, die aus immunverwandten Erkrankungen und Krankheiten, Organtransplantation, Myocardialinfarkt, kardiovaskuläre Erkrankung, Schlaganfall, Nierenversagen, mit oxidativem Stress verbundene neurodegenerative Erkrankungen und Krebs besteht, ausgewählt wird. Am bevorzugtesten beinhalten die immunverwandten Erkrankungen und Krankheiten, sind aber nicht darauf beschränkt, rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose und Autoimmunerkrankungen.

**[0075]** Die Erfindung betrifft Verfahren der Behandlung oder Prävention einer Erkrankung oder Krankheit durch Verabreichen einer Substanz, die die Aktivität des Kinase-Polypeptids STLK2 moduliert, an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf. Bevorzugt wird die Erkrankung oder Krankheit aus der Gruppe, die aus immunverwandten Erkrankungen und Krankheiten, myocardialer Infarkt, Kardiomyopathie, Schlaganfall, Nierenversagen und mit oxidativem Stress verbundene neurodegenerative Erkrankungen besteht, ausgewählt. Bevorzugter werden die immunverwandten Erkrankungen und Krankheiten aus der Gruppe, die aus rheumatoider Arthritis, einer chronischen Entzündung des Darms, einer chronischen Entzündung des Beckens, multipler Sklerose, Asthma, Osteoarthritis, Psoriasis, Atherosclerose, Rhinitis, Autoimmunität und Organtransplantation besteht, ausgewählt.

**[0076]** Substanzen, die für die Behandlung von mit Kinase bezogenen Erkrankungen oder Krankheiten verwendbar sind, zeigen bevorzugt positive Ergebnisse in einem oder mehreren *in vitro* Assays für eine Aktivität, die zu der Behandlung der besagten Erkrankung oder Krankheit korrespondiert (Beispiele dieser Assays sind in den Referenzen in Sektion VI, unten bereitgestellt). Beispiele für Substanzen, die für eine favorisierte Aktivität gescreent werden können, sind in Sektion VI unten bereitgestellt und mit Verweisen versehen. Die Substanzen, die die Aktivität der Kinasen modulieren, beinhalten bevorzugt, sind aber nicht darauf beschränkt, Antisenseoligonukleotide und Inhibitoren von Proteinkinasen, wie durch die Verfahren und Screens, die unten in Sektion VI mit Verweisen versehen sind, bestimmt.

**[0077]** Der Begriff „Verhindern“ betrifft die Verringerung der Wahrscheinlichkeit, dass ein Organismus an einer abnormen Bedingung erkrankt oder sie entwickelt.

**[0078]** Der Begriff „behandeln“ betrifft eine therapeutische Wirkung zu haben und wenigstens teilweise eine abnorme Bedingung in dem Organismus zu erleichtern oder abzuschaffen.

**[0079]** Der Begriff „therapeutische Wirkung“ betrifft die Inhibierungs- oder Aktivierungsfaktoren, die die abnorme Bedingung verursachen oder zu ihr beitragen. Eine therapeutische Wirkung befreit in einem gewissen Ausmaß von einem oder mehreren der Symptome der abnormen Bedingung. In Bezug auf die Behandlung abnormer Bedingungen kann eine therapeutische Wirkung sich auf eines oder mehrerer der folgenden beziehen: (a) einen Anstieg in der Proliferation, dem Wachstum und/oder der Differentiation der Zellen; (b) Inhibierung (d.h. Verlangsamung oder Stoppen) des Zelltodes; (c) Inhibierung der Degeneration; (d) Erleichterung in gewissem Ausmaß von einem oder mehreren der Symptome, die mit der abnormen Bedingung verbunden sind und (e) Steigern der Funktion der beeinflussten Population der Zellen. Verbindungen, die eine Effizienz gegenüber abnormen Bedingungen zeigen, können wie hier beschrieben identifiziert werden.

**[0080]** Der Begriff „abnorme Bedingung“ betrifft eine Funktion in den Zellen oder den Geweben eines Organismus, die von ihrer normalen Funktion in dem Organismus abweicht. Eine abnorme Bedingung kann sich auf die Zellproliferation, die Zelldifferentiation oder das Zellüberleben beziehen.

**[0081]** Abnorme Zellproliferationsbedingungen beinhalten Krebs, wie z.B. fibrotische und mesangiale Erkrankungen, abnormale Angiogenese und Vaskulogenese, Wundheilung, Psoriasis, Diabetes Mellitus und Entzündung.

**[0082]** Abnorme Differenzierungsbedingungen beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, neurodegenerative Erkrankungen, langsame Wundheilungsgeschwindigkeiten und langsame Heilungsgeschwindigkeiten von verpflanztem Gewebe.

**[0083]** Abnorme Zellüberlebensbedingungen betreffen Bedingungen, bei denen programmierte Zelltodwege (Apoptose) aktiviert oder außer Kraft gesetzt werden. Eine Anzahl von Proteinkinasen ist mit Apoptosewegen verbunden. Abweichungen in der Funktion von irgendeiner der Proteinkinasen könnte zu Zellunsterblichkeit oder zu vorzeitigem Zelltod führen.

**[0084]** Der Begriff „Abweichung“ in Zusammenhang mit der Funktion der Kinase in einem Signalübertragungsverfahren betrifft eine Kinase, die über- oder unterexprimiert in einem Organismus ist, die mutiert ist, so dass ihre katalytische Aktivität niedriger oder höher ist als Proteinkinaseaktivität eines Wildtyps, die mutiert ist, so dass sie nicht länger mit einem natürlichen Bindungspartner wechselwirken kann, die nicht länger durch andere Proteinkinase oder andere Proteinphosphatase modifiziert wird oder die nicht länger mit einem natürlichen Bindungspartner wechselwirkt.

**[0085]** Der Begriff „Verabreichen“ betrifft ein Verfahren des Einschließens einer Verbindung in Zellen oder Geweben eines Organismus. Die abnorme Bedingung kann verhindert oder behandelt werden, wenn die Zellen oder die Gewebe des Organismus innerhalb des Organismus oder außerhalb des Organismus existieren. Zellen, die außerhalb des Organismus existieren, können in Zellkulturschalen aufrecht erhalten oder gezüchtet werden. Für Zellen, die innerhalb des Organismus beherbergt sind, existieren viele Techniken im Stand der Technik, um Verbindungen, einschließlich (aber nicht darauf beschränkt) oral, parenteral, dermal, per Injektions und Aerosolanwendungen, zu verabreichen. Für Zellen außerhalb des Organismus existieren mehrere Techniken im Stand der Technik, um die Verbindungen zu verabreichen, einschließlich (aber nicht darauf beschränkt) Zellmikroinjektionstechniken, Transformationstechniken und Trägertechniken.

**[0086]** Die abnorme Bedingung kann ebenfalls verhindert oder behandelt werden durch Verabreichen einer Verbindung zu einer Zellgruppe mit einer Abweichung in einem Signalübertragungsweg an einem Organismus. Die Wirkung der Verabreichung einer Verbindung auf eine Organismusfunktion kann dann beobachtet werden. Der Organismus ist bevorzugt eine Maus, Ratte, Kaninchen, Guineaschwein oder Ziege, bevorzugter ein Affe oder Menschenaffe und am bevorzugtesten ein Mensch.

**[0087]** In einem elften Aspekt betrifft die Erfindung Verfahren zur Bestimmung eines Kinase-Polypeptids in einer Probe als ein diagnostisches Werkzeug für Erkrankungen oder Krankheiten, wobei das Verfahren die Schritte umfasst: (a) In-Kontaktbringen der Probe mit einer Nukleinsäuresonde, die unter Hybridisierungsbedingungen an eine Nukleinsäuretargetregion des Kinase-Polypeptids STLK2 hybridisiert, wobei die Sonde die Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid, Fragmente davon und die Komplemente der Sequenzen und Fragmente kodiert, umfasst, und (b) Detektieren des Vorhandenseins oder der Menge des Sonde:Targetregion-Hybrids als einen Hinweis auf die Erkrankung.

**[0088]** In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird die Erkrankung oder Krankheit aus der Gruppe, die aus rheumatoider Arthritis, Artherosklerose, Autoimmunerkrankungen, Organtransplantation, Myocardialinfarkt, Kardiomyopathie, Schlaganfall, Nierenversagen, mit oxidativem Stress verbundene neurodegenerative Erkrankungen und Krebs besteht, ausgewählt.

**[0089]** Die Kinase „Target-Region“ ist die Nukleotidbasissequenz SEQ ID Nr. 1, ein funktionales Derivat davon oder ein Fragment davon, an welches die Nukleinsäuresonde spezifisch hybridisieren wird. Spezifische Hybridisierung weist daraufhin, dass in Gegenwart anderer Nukleinsäuren die Sonde nur detektierbar mit der Kinase der Target-Region der Erfindung hybridisiert. Vermeintliche Target-Regionen können durch Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, identifiziert werden, wobei sie aus einer Ausrichtung und dem Vergleich der am meisten verwandten Sequenzen in der Datenbasis bestehen.

**[0090]** In bevorzugten Ausführungsformen hybridisiert die Nukleinsäuresonde an eine Kinase-Targetregion, die für wenigstens 6, 12, 75, 90, 105, 120, 150, 200, 250, 300 oder 350 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Sequenz oder der korrespondierenden Aminosäuresequenz ganzer Länge oder eines funktionalen Derivates davon kodiert. Die Hybridisierungsbedingungen sollten so sein, dass die Hybridisierung nur mit den Kinasegenen in Gegenwart anderer Nukleinsäuremoleküle auftritt. Unter strengen Hybridisierungsbedingungen hybridisieren nur hoch komplementäre Nukleinsäuresequenzen. Bevorzugt verhindern diese Bedingungen die Hybridisierung von Nukleinsäuren mit mehr als einem oder zwei Fehlstellen von 20 aufeinanderfolgenden Nukleotiden. Diese Bedingungen werden unten definiert.

**[0091]** Die Erkrankungen, für die die Detektion von Kinasegenen in einer Probe diagnostisch sein kann, beinhalten Erkrankungen, bei denen die Kinasenukleinsäure (DNA und/oder RNA) in Vergleich zu normalen Zellen amplifiziert wird. Mit „Amplifizierung“ ist eine steigende Anzahl von Kinase-DNA oder RNA in einer Zelle verglichen mit normalen Zellen gemeint. In normalen Zellen werden Kinasen typischerweise als einfache Kopiergene gefunden. Bei ausgewählten Erkrankungen kann der chromosomal Aufenthaltsort der Kinasegene amplifiziert werden, was in mehrfachen Kopien der Gene oder Amplifikation resultiert. Genamplifikation kann zu Amplifikation von Kinase-RNA führen oder Kinase-RNA kann in Abwesenheit von Kinase-DNA-Amplifikation amplifiziert werden.

**[0092]** „Amplifikation“ kann, wenn es RNA betrifft, die detektierbare Gegenwart von Kinase RNA in Zellen sein, da es in einigen normalen Zellen keine basale Exprimierung von Kinase-RNA gibt. In anderen normalen Zellen existiert ein basales Niveau der Exprimierung von Kinase, weshalb in diesen Fällen Amplifikation die Detektion von wenigstens dem 1-2-fachen und bevorzugt mehr von Kinase-RNA, verglichen mit dem basalen Niveau, ist.

**[0093]** Die Erkrankungen, die durch die Detektion der Kinase-Nukleinsäure in einer Probe diagnostiziert werden können, beinhalten bevorzugt Krebs. Die Testproben, die für Nukleinsäuresonderverfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, beinhalten z.B. Zellen oder Nukleinsäureextrakte von Zellen oder biologische Flüssigkeiten. Die in den oben beschriebenen Verfahren verwendeten Proben werden variieren, basierend auf dem Assay-Format, dem Detektionsverfahren und der Natur der Gewebe, Zellen oder Extrakte, die untersucht werden sollen. Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäureextrakten von Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt und können leicht angepasst werden, um eine Probe zu erhalten, die mit dem verwendeten Verfahren kompatibel ist.

**[0094]** In einem letzten Aspekt betrifft die Erfindung ein Erfahren zur Detektion eines Kinase-Polypeptids in einer Probe als ein diagnostisches Werkzeug für eine Erkrankung oder Krankheit, wobei das Verfahren umfasst: (a) Vergleichen einer Nukleinsäuretargetregion, die für das Kinase-Polypeptid in einer Probe kodiert, wobei das Kinase-Polypeptid STL2 ist oder ein oder mehrere Fragmente davon, mit einer Kontrollnukleinsäure-targetregion, die für das Kinase-Polypeptid oder ein- oder mehrere Fragmente davon kodiert und (b) Detektieren der Unterschiede in der Sequenz oder der Menge zwischen der Targetregion und der Kontrolltargetregion als ein Hinweis auf die Erkrankung oder Krankheit. Bevorzugt wird die Erkrankung oder Krankheit aus der Gruppe, die aus immunbezogenen Erkrankungen oder Krankheiten, Organtransplantation, Myocardialinfarkt, kardiovaskuläre Erkrankung, Schlaganfall, Nierenversagen, mit oxidativem Stress verbundene neurodegenerative Erkrankungen und Krebs besteht, ausgewählt. Immunbezogene Erkrankungen und Krankheiten beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, die zuvor diskutierten.

**[0095]** Der Begriff „Vergleichen“, wie er hier verwendet wird, betrifft die Identifizierung von Unterschieden zwischen der Nukleinsäuretargetregion, die aus einer Probe isoliert wird, und der Kontrollnukleinsäure-Targetregion. Diese Unterschiede können in den Nukleotidsequenzen, z.B. Insertionen, Entferungen oder Punktmutationen oder in der Menge der gegebenen Nukleotidsequenz sein. Verfahren zur Bestimmung dieser Unterschiede in den Sequenzen sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt. Die „Kontroll“-Nukleinsäuretargetregion betrifft die Sequenz oder die Menge der Sequenz, die in normalen Zellen gefunden wurde, z.B. Zellen, die nicht erkrankt sind, wie zuvor diskutiert.

**[0096]** Die Erfindung ist hier breit und generisch beschrieben worden. Jede der engeren Spezies und untergenerischen Gruppen, die innerhalb der generischen Offenbarung fallen, bilden ebenfalls einen Teil der Erfindung. Dies beinhaltet die generische Beschreibung der Erfindung mit dem Vorbehalt oder der negativen Beschränkung, die irgendeinen Gegenstand von dem Genus entfernt, unabhängig ob das ausgeschlossene Material hier spezifisch wiedergegeben ist oder nicht.

**[0097]** Die Zusammenfassung der oben beschriebenen Erfindung ist nicht beschränkt und andere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung der Erfindung und aus den Ansprüchen offensichtlich werden.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

**[0098]** **Fig. 1** zeigt eine mehrfache Sequenzausrichtung der Aminosäuresequenzen der Kinasen der STE20-STE20 Familien.

**[0099]** **Fig. 2** zeigt die Aminosäuresequenz des menschlichen STL2.

**[0100]** **Fig.** 3 zeigt die Nukleinsäuresequenz des menschlichen STLK2.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0101]** Die vorliegende Erfindung betrifft teilweise Kinase-Polypeptide, Nukleinsäuren, die für diese Polypeptide kodieren, Zellen, die die Nukleinsäuren enthalten, Antikörper für diese Polypeptide, Assays, die die Polypeptide verwenden, und Verfahren, die sich auf das gesamte zuvor genannte beziehen. Die vorliegende Erfindung basiert auf der Isolierung und Charakterisierung neuer Kinase-Polypeptide. Die Polypeptide und Nukleinsäuren können unter Verwendung gut bekannter und Standardsynthesetechniken hergestellt werden, wenn die hier vorliegenden Sequenzen gegeben sind.

**[0102]** Die kürzliche Aufklärung der DNA-Sequenz von *Saccharomyces cerevesiae* hat das erste vollständige Beispiel der genetischen Information, die in einem einfachen eukaryotischen Organismus enthalten ist, bereitgestellt. Die Analyse dieses Hefegenoms hat aufgedeckt, dass es wenigstens 113 Proteinkinasen enthält. Diese Kinasen waren weiter in verschiedene strukturelle verbundene Gruppen unterteilt. Eine dieser neu definierten Gruppen wurde als STE20-Familie bezeichnet, um sein Gründungselement STE20 zu repräsentieren, welches eine Proteinkinase ist, die in dem Hefepheromon-Antwortweg, der eine Proteinkinasekaskade als Antwort auf ein durch ein G-Protein vermitteltes Signal startet, involviert ist. *S. cerevesiae* hat zwei zusätzliche Elemente dieser Familie, CLA4 und YOL113W (HRA655).

**[0103]** Verschiedene Säugetierhomologe sind kürzlich identifiziert worden, die zu der STE20-Familie gehören, einschließlich SOK-1 (menschliches STE20), GC-Kinase, KHS, HPK1, NIK, SLK, GEK, PAK1, PAK65, MST1 und CDC7. Des Weiteren haben die *Drosophila* und die *C. elegans* Genom-Anstrengungen zusätzliche Proteinkinasen identifiziert, welche zu der STE20-Familie gehören, wobei sie bis jetzt strukturell einzigartige extra katalytische Domains, einschließlich ZC504.4 und SULU-Kinasen von *C. elegans* und NINAC von *Drosophila*, haben.

**[0104]** STE20 bezogene Proteinkinasen schließen die Regulierung einer Vielzahl von zellulären Antworten, einschließlich der Antwort auf Wachstumsfaktoren oder Cytokine, oxidative-, UV- oder strahlungsbezogene Stresswege, Entzündungssignale (d.h. TNF $\alpha$ ), apoptotische Stimulanz (d.h. Fas), T- und B-Zellen Co-Stimulation, die Kontrolle von cytoskeletaler Architektur und zelluläre Transformation, mit ein. Typischerweise dienen die STE20 bezogenen Kinasen als Stromaupwärtsregulatoren von MAPK Kaskaden. Die Beispiele beinhalten: HPK1, eine Protein-Serin/Threonin-Kinase (STK), die eine STE20 ähnliche Kinase-Domäne besitzt, die einen Protein-Kinaseweg aktiviert, der zu der stressaktivierten Proteinkinase SAPK/JNK führt; PAK1, ein STK mit einer Stromaupwärts CDC42-Bindungsdomäne, die mit Rac wechselwirkt und eine Rolle in der zellulären Transformation durch den Ras-MAPK-Weg spielt und murine NIK, welche mit Stromaupwärtsrezeptortyrosinkinasen wechselwirkt und mit Stromaupwärts-STE11-Familienkinasen verbunden ist.

**[0105]** Die STE20-Kinasen besitzen eine Vielzahl nicht katalytischer Domains, von denen angenommen wird, dass sie mit Stromaupwärts-Regulatoren wechselwirken. Beispiele beinhalten Prolin-reiche Domänen für die Wechselwirkung mit SH3-haltigen Proteinen oder spezifische Domänen für die Wechselwirkung mit Rac, Rho und Rab kleinen G-Proteinen. Diese Wechselwirkungen können einen Mechanismus für die Kreuzkommunikation zwischen unterschiedlichen biochemischen Wegen als Antwort auf externe Stimuli, wie z.B. die Aktivierung einer Vielzahl von Zelloberflächenrezeptoren, einschließlich Tyrosin-Kinasen, Cytokin-Rezeptoren, TNF Rezeptor, Fas, T-Zellrezeptoren, CD28 oder CD40, sein.

#### I. Die Nukleinsäuren der Erfindung

**[0106]** Beinhaltet in dem Umfang dieser Erfindung sind die funktionalen Äquivalente der hier beschriebenen isolierten Nukleinsäuremoleküle. Die Degeneration des genetischen Codes ermöglicht die Substitution bestimmter Kodons durch andere Kodons, die dieselbe Aminosäure spezifizieren und damit zum selben Protein führen. Die Nukleinsäuresequenz kann substantiell variieren, da, mit der Ausnahme von Methionin und Tryptophan, die bekannten Aminosäuren von mehr als einem Codon kodiert werden können. Somit könnten Teile oder die gesamten Kinasegene der Erfindung synthetisiert werden, um eine Nukleinsäuresequenz zu ergeben, die sich signifikant von der, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, unterscheidet. Die kodierte Aminosäuresequenz davon würde jedoch bewahrt werden.

**[0107]** Zusätzlich kann die Nukleinsäuresequenz eine Nukleotidsequenz umfassen, die aus der Addition, Be- seitigung oder Substitution von wenigstens einem Nukleotid an dem 5'-Ende und/oder 3'-Ende der Nukleinsäureformel, die in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist, oder eines Derivates davon resultiert. Irgendein Nukleotid oder Poly-

nukleotid kann in diesem Zusammenhang verwendet werden, vorausgesetzt, dass seine Addition, Beseitigung oder Substitution nicht die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2, welche durch die Nukleotidsequenz kodiert ist, ändert. Zum Beispiel ist in der vorliegenden Erfindung beabsichtigt, irgendeine Nukleinsäuresequenz einzuschließen, die aus der Addition von ATG als ein Startcodon an dem 5'-Ende der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivats oder durch die Addition von TTA, TAG oder TGA als ein Endcodon am 3'-Ende der erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz oder dessen Derivat resultiert. Außerdem kann das Nukleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung wenn notwendig Restriktionsendonuclease-Erkennungsseiten haben, die an sein 5'-Ende und/oder 3'-Ende hinzugefügt wurde.

**[0108]** Diese funktionalen Abänderungen einer gegebenen Nukleinsäuresequenz erfordern eine Möglichkeit, um die Sekretion und/oder die Verarbeitung heterologer Proteine, die für fremde Nukleinsäuresequenzen, die daran fusioniert sind, kodieren, zu unterstützen. Alle Variationen der Nukleotidsequenz der Kinasegene der Erfindung und Fragmente davon, die durch den genetischen Code erlaubt sind, sind deshalb in dieser Erfindung beinhaltet.

**[0109]** Des Weiteren ist es möglich, Codons zu entfernen oder ein oder mehrere Codons mit Codons mit Außnahme von degenerativen Codons zu substituieren, um ein strukturell modifiziertes Polypeptid zu herzustellen, aber eines, das im wesentlichen dieselbe Verwendung oder Aktivität wie das durch das unmodifizierte Nukleinsäuremolekül hergestellte Polypeptid hat. Wie im Stand der Technik erkennbar, sind die zwei Polypeptide funktional äquivalent, wie es die zwei Nukleinsäuremoleküle sind, die zu ihrer Herstellung führen, obwohl gerade die Unterschiede zwischen den Nukleinsäuremolekülen nicht mit der Degeneration des genetischen Codes verbunden sind.

#### Säugetier STLK2

**[0110]** Die menschliche STLK2 cDNA ganzer Länge (SEQ ID Nr. 1) ist 3268 bp lang und besteht aus einem 1248 bp offener Leserahmen (ORF) flankiert von einer 181 bp 5' nicht übersetzten Region (UTR; 1-181) und einem 1784 bp 3' UTR (1433-3216), die von einer polyadenylierten Region mit 52 Nukleotiden gefolgt wird. Ein Polyadenylierungs signal (AATAAA) wird an den Positionen (3193-3198) gefunden. Die Sequenz, die das erste ATG flankiert, passt zu dem Kozak Consensus (Kozak, M., Nucleic Acids Res. 15, 8125-8148 (1987)) für ein initiierendes Methionin und man nimmt an, dass es die translationale Startseite für STLK2 ist. Des Weiteren bewahren menschliches STLK2 und die verbundenen SOK-1 und MST3 Proteine die Aminosäuresequenz sofort im Anschluss an dieses vorausgesetzte initiierende Methionin.

**[0111]** Verschiedene EST-Fragmente überspannen die vollständige STLK2-Sequenz mit AA191319 an dem 5'Ende und W16504 an dem 3'Ende.

#### II. Nukleinsäuresonden, Verfahren und Kits zur Bestimmung von STE20-bezogenen Kinasen

**[0112]** Eine Nukleinsäuresonde der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um eine chrosomale oder cDNA Bibliothek durch gewöhnliche Hybridisierungsverfahren zu untersuchen, um andere Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung zu erhalten. Eine chromosomale DNA oder cDNA Bibliothek kann aus geeigneten Zellen gemäß im Stand der Technik anerkannten Verfahren hergestellt werden. (siehe. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Sambrook, Fritsch & Maniatis, eds., 1989).

**[0113]** Alternativ kann eine chemische Synthese durchgeführt werden, um Nukleinsäuresonden mit Nukleotidsequenzen zu erhalten, welche mit den N-endständigen und C-endständigen Teilen der Aminosäuresequenz des Polypeptids von Interesse korrespondieren. Die synthetisierten Nukleinsäuresonden können als Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die in Übereinstimmung mit anerkannten PCR-Techniken durchgeführt wird, im wesentlichen gemäß den PCR-Protokollen, „A Guide to Methods and Applications“, Academic Press, Michael, et al., eds. 1990, verwendet werden, wobei die geeignete chromosomale oder cDNA Bibliothek verwendet wird, um das Fragment der vorliegenden Erfindung zu erhalten.

**[0114]** Der Durchschnittsfachmann kann schnell diese Sonden, die auf der hier offenbarten Sequenz basieren, unter Verwendung von Verfahren der Computerausrichtung und Sequenzanalyse, die im Stand der Technik bekannt sind („Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, 1989, supra) entwerfen. Die Hybridisierungssonden der vorliegenden Erfindung können durch Standardmarkierungstechniken, wie z.B. Radiomarkierung, Enzymmarkierung, Fluoreszenzmarkierung, Biotin-Avidin Markierung, Chemilumineszenz und ähnliches markiert werden. Nach der Hybridisierung können die Sonden unter Verwendung bekannter Verfahren visualisiert

werden.

**[0115]** Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung beinhalten RNA- als auch DNA-Sonden, wobei die Sonden unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Techniken hergestellt werden. Die Nukleinsäuresonde kann auf einem festen Träger immobilisiert werden. Beispiele dieser festen Träger beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Kunststoffe, wie z.B. Polycarbonat, Komplexkohlenwasserstoffe, wie z.B. Agarose und Sepharose, und Acrylharze, wie z.B. Polyacrylamid und Latexkugelchen. Techniken zum Koppeln der Nukleinsäuresonden an diese festen Träger sind im Stand der Technik gut bekannt.

**[0116]** Die Testproben, die für Nukleinsäureuntersuchungsverfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, beinhalten z.B. Zellen oder Nukleinsäureextrakte von Zellen oder biologische Flüssigkeiten. Die in den oben beschriebenen Verfahren verwendeten Proben werden, basierend auf dem Assay-Format, dem Detektionsverfahren und der Natur der Gewebe, Zellen oder Extrakte, die untersucht werden sollen, variieren. Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäureextrakten von Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt und können leicht angepasst werden, um eine Probe zu erhalten, die mit dem verwendeten Verfahren kompatibel ist.

**[0117]** Ein Verfahren zur Bestimmung des Vorhandenseins von Nukleinsäuren der Erfindung in einer Probe umfasst (a) das In-Kontakt-bringen der Probe mit der oben beschriebenen Nukleinsäuresonde unter Bedingungen, so dass Hybridisierung auftritt, und (b) das Detektieren des Vorhandenseins der an das Nukleinsäuremolekül gebundenen Sonde. Der Durchschnittsfachmann würde die Nukleinsäuresonde gemäß dem im Stand der Technik bekannten Techniken wie oben beschrieben auswählen. Proben, die getestet werden sollen, beinhalteten RNA-Proben von menschlichem Gewebe, sollten aber nicht darauf beschränkt sein.

**[0118]** Ein Kit zum Bestimmen des Vorhandenseins von Nukleinsäuren der Erfindung in einer Probe umfasst wenigstens ein Behältermittel, wobei darin die oben beschriebene Nukleinsäuresonde enthalten ist. Das Kit kann weiter andere Behälter umfassen, die ein oder mehrere der folgenden umfassen: Waschreagenzien und Reagenzien, die das Vorhandensein von gebundener Nukleinsäuresonde bestimmen können. Beispiele von Detektionsreagenzien beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, radiomarkierte Sonden, enzymatisch markierte Sonden (Merrettichperoxidase, Alkaliphosphatase) und affinitätsmarkierte Sonden (Biotin, Avidin oder Steptavidin).

**[0119]** Im Detail beinhaltet ein in Abteilungen aufgeteiltes Kit irgendein Kit, in welchem Reagenzien in getrennten Behältern enthalten sind. Diese Behälter beinhalten kleine Glasbehälter, Plastikbehälter oder Streifen von Plastik oder Papier. Diese Behälter ermöglichen den wirksamen Transfer der Reagenzien aus einem Abteil zu einem anderen Abteil, so dass die Proben und Reagenzien nicht kreuzkontaminiert werden und die Agentien oder Lösungen eines jeden Behälters in einer quantitativen Art und Weise von einem Abteil in das andere gegeben werden können. Diese Behälter werden einen Behälter beinhalten, der die Testprobe annehmen wird, einen Behälter, der die Sonde oder die Primer, die in dem Assay verwendet werden, enthält, Behälter, die Waschreagenzien (wie z.B. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Tris-Puffer und ähnliches) enthalten und Behälter, die die Reagenzien enthalten, die verwendet werden, um die hybridisierte Sonde, den gebundenen Antikörper, das amplifizierte Produkt oder ähnliches zu detektieren. Der Durchschnittsfachmann wird leicht erkennen, dass die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresonden leicht in eines der etablierten Kitformate, die im Stand der Technik gut bekannt sind, eingefügt werden können.

### III. DNA-Konstruktionen, die ein STE20-bezogenes Nukleinsäuremolekül und Zellen, die diese Konstruktionen enthalten, umfassen

**[0120]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein rekombinantes DNA-Molekül, das 5' bis 3', einen Promoter, der wirksam die Transkription in einer Wirtszelle beginnen kann und die oben beschriebenen Nukleinsäuremoleküle umfasst. Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung ein rekombinantes DNA-Molekül, das einen Vektor und ein oben beschriebenes Nukleinsäuremolekül umfasst. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Nukleinsäuremolekül, das eine transkriptionale Region, die einer Zelle funktional ist, eine Sequenz, die einer RNA-Sequenz, die für eine Aminosäuresequenz, die dem oben beschriebenen Polypeptid entspricht, kodiert, komplementär ist und eine transkriptionale Endregion, die in der Zelle funktional ist, umfasst. Die oben beschriebenen Moleküle können isolierte und/oder gereinigte DNA-Moleküle sein.

**[0121]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls eine Zelle oder einen Organismus, der ein oben beschriebenes Nukleinsäuremolekül enthält und dabei ein Polypeptid exprimieren kann. Das Polypeptid kann aus Zellen, die verändert wurden, um das Polypeptid zu exprimieren, gereinigt werden. Eine Zelle ist „verändert um ein gewünschtes Polypeptid zu exprimieren“, wenn die Zelle durch genetische Manipulation dazu gebracht

wird, ein Protein herzustellen, welches sie normalerweise nicht herstellt oder welches die Zelle normalerweise mit niedrigem Niveau erzeugt. Der Durchschnittsfachmann kann die Verfahren zur Einführung und Expressierung von entweder genomischen, cDNA oder synthetischen Sequenzen in entweder eukaryotische oder prokaryotische Zellen leicht anpassen.

**[0122]** Ein Nukleinsäuremolekül, wie z.B. DNA, ist „in der Lage zu exprimieren“ ein Polypeptid, wenn es Nukleotidsequenzen enthält, die transkriptionale und translationale regulatorische Information enthält und solche Sequenzen sind „operativ verbunden“ mit Nukleotidsequenzen, die für ein Polypeptid kodieren. Eine operable Verbindung ist eine Verbindung, bei der die regulatorische DNA-Sequenzen und die DNA-Sequenz, die exprimiert werden soll, auf eine solche Art und Weise verbunden werden, damit sie die Gensequenzexprimierung ermöglichen. Die exakte Natur der regulatorischen Regionen, die für Gensequenzexprimierung benötigt wird, kann von Organismus zu Organismus variieren, sollte aber im allgemeinen eine Promoter-Region beinhalten, welche in Prokaryoten sowohl den Promotern (der den Start der RNA-Transkription dirigiert) als auch die DNA-Sequenzen, die, wenn sie in die RNA transkribiert werden, den Synthesebeginn signalisieren werden, enthalten. Diese Regionen werden normalerweise diese 5'-nichtkodierenden Sequenzen, die mit dem Start der Transkription und Translation verbunden sind, wie z.B. die TATA Box, Kap-Sequenz, CAAT-Sequenz und ähnliches, beinhalten.

**[0123]** Wenn notwendig kann die nicht-kodierende Region 3' zu der Sequenz, die für die Kinase der Erfindung kodiert, durch die oben beschriebenen Verfahren erhalten werden. Diese Region kann für ihre transkriptionalen Endegulatorsequenzen, wie z.B. Beendigung und Polyadnylierung, aufrecht erhalten werden. Somit können durch Aufrechterhalten der 3'-Region, die natürlicherweise der DNA-Sequenz, die für die Kinase der Erfindung kodiert, folgt, die transkriptionalen Endsignale bereitgestellt werden. Wo die transkriptionalen Endsignale nicht bei der Expressierung der Wirtszelle ausreichend funktional sind, kann dann eine 3' Region funktional in die Wirtszelle substituiert werden.

**[0124]** Zwei DNA-Sequenzen (wie z.B. Promoterregionsequenz und eine Sequenz, die für die Kinase der Erfindung kodiert) sind operativ verbunden, wenn die Natur der Verbindung zwischen den beiden DNA-Sequenzen nicht (1) in der Einführung einer Rahmen-Shift Mutation resultiert, (2) mit der Fähigkeit der Promoter-Region-Sequenz interferiert, die Transkription einer Gensequenz, die für die Kinase der Erfindung kodiert, zu dirigieren, oder (3) mit der Fähigkeit der Gensequenz der Kinase der Erfindung interferiert, durch die Promoterregionsequenz transkribiert zu werden. Somit würde eine Promoterregion operativ mit einer DNA-Sequenz verbunden sein, wenn der Promoter die Transkription der DNA-Sequenz beeinflussen kann. Somit sind transkriptionale und translationale Signale, die von einem geeigneten Wirt erkannt werden, notwendig, um ein Gen, das für die Kinase der Erfindung kodiert, zu exprimieren.

**[0125]** Die vorliegende Erfindung umfasst die Expressierung eines Gens, das für die Kinase der Erfindung (oder ein funktionelles Derivat davon) entweder in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen kodiert. Prokaryotische Werte sind im allgemeinen sehr effizient und angemessen für die Herstellung von rekombinanten Proteinen und sind deshalb ein Typ eines bevorzugten Expressionsystems für Kinasen der Erfindung. Prokaryoten werden am häufigsten durch verschiedene Stämme von *E. coli* repräsentiert. Andere mikrobielle Stämme können ebenfalls verwendet werden, einschließlich anderer bakterieller Stämme.

**[0126]** In prokaryotischen Systemen können Plasmidvektoren, die die Replikationsseiten und Kontrollsequenzen, die sich aus einer Spezies, die mit dem Wirt kompatibel ist, ableiten, verwendet werden. Beispiele geeigneter Plasmidvektoren können pBR322, pUC118, pUC119 und ähnliches beinhalten; geeignete phage oder bakteriophage Vektoren können ygt10, ygt11 und ähnliches beinhalten; und geeignete Virusvektoren können pMAM-neo, pKRC und ähnliches beinhalten. Bevorzugt hat der ausgewählte Vektor der vorliegenden Erfindung die Kapazität, um in der ausgewählten Wirtszelle repliziert zu werden.

**[0127]** Anerkannte prokaryotische Werte beinhalten Bakterien, wie z.B. *E. coli*, *Bazillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* und ähnliche. Unter diesen Bedingungen werden die Polypeptide jedoch nicht glycosyliert. Der prokaryotische Wirt muss mit dem Replikon und den Kontrollsequenzen in dem Expressionsplasmid kompatibel sein.

**[0128]** Um die Kinase der Erfindung (oder ein funktionelles Derivat davon) in einer prokaryotischen Zelle zu exprimieren, ist es notwendig, die Sequenz, die für die Kinase der Erfindung kodiert, an einen funktionalen prokaryotischen Promoter operativ zu binden. Diese Promoter können entweder konstitutiv oder bevorzugter regulierbar sein (d.h. induzierbar oder derepressibel). Beispiele für konstitutive Promoter beinhalten den int Promoter der Bakteriophage  $\lambda$ , den bla Promoter der  $\beta$ -Lactamase Gensequenz von pBR322 und den cat Promo-

ter der Chloramphenicolacetyltransferase-Gensequenz von pPR325 und ähnliche. Beispiele von induzierbaren prokaryotischen Promotern beinhalten die Hauptrechts- und Linkspromoter der Bakteriophage  $\lambda$  ( $P_L$  und  $P_R$ ), die *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI* und *gal* Promotoren von *E. coli*, der  $\alpha$ -Amylase (Ulmanen et al., *J. Bacteriol.* 162:176-182, 1985) und die  $\zeta$ -28 spezifischen Promoter von *B. subtilis* (Gilman et al., *Gene Sequence* 32:11-20, 1984), den Promotoren der Bakteriophage von *Bacillus* (Gryczan, In: *The Molecular Biology of the Bacteria*, Academic Press, Inc., NY, 1982), und *Streptomyces* Promoter (Ward et al., *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478, 1986). Prokaryotische Promotoren werden von Glick rezensiert (Ind. *Microbiol.* 1:277-282, 1987), Cenatiempo (*Biochimie* 68:505-516, 1986) und Gottesman (Ann. *Rev. Genet.* 18:415-442, 1984).

**[0129]** Eine saubere Exprimierung in einer prokaryotischen Zelle erfordert ebenfalls das Vorhandensein eines Aufstroms einer Ribosom-Bindungsseite der Gensequenz-Kodierungssequenz. Diese Ribosom-Bindungsseiten werden zum Beispiel von Gold et al. offenbart (Ann. *Rev. Microbiol.* 35:365-404, 1981). Die Auswahl von Kontrollsequenzen, Exprimierungsvektoren, Transformationsverfahren und ähnliches sind vom Typ der Wirtszelle, die verwendet wird, um das Gen zu exprimieren, abhängig. Wie hier verwendet können „Zelle“, „Zelllinie“ und „Zellkultur“ austauschbar verwendet werden und alle diese Bezeichnungen beinhalten Vermehrung. Somit beinhalten die Worte „Transformanten“ oder „transformierte Zellen“ die hauptsächlichen Gegenstandszelle und -kulturen, die sich davon ableiten, ohne Blick auf die Anzahl der Transfers. Es ist ebenfalls verständlich, dass alle Vermehrung nicht präzise mit dem DNA-Gehalt identisch ist, aufgrund freisetzender oder versehentlicher Mutationen. Mutantvermehrung hat jedoch, wie definiert, die gleiche Funktionalität, wie die der ursprünglich transformierten Zelle.

**[0130]** Wirtszellen, die in den Exprimierungssystemen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind nicht streng limitiert, vorausgesetzt, dass sie für die Verwendung bei der Exprimierung des Kinase-Polypeptids von Interesse geeignet sind. Geeignete Wirte können oft eukaryotische Zellen beinhalten. Bevorzugte eukaryotische Wirte beinhalten z.B. Hefe, Pilz, Insektenzellen, Säugetierzellen entweder *in vivo* oder in Zellkulturen. Säugetierzellen, die als Wirte verwendbar sind, beinhalten HeLa Zellen, Zellen von fibroplastischem Ursprung, wie z.B. VERO oder CHO-K1, oder Zellen lymphoiden Ursprungs und ihre Derivate. Bevorzugte Säugetierwirtszellen beinhalten SP2/0 und J558L, als auch Neuroblastomzelllinien, wie z.B. IMR 332, die bessere Kapazitäten für das richtige posttranskriptionale Verfahren bereitstellen.

**[0131]** Zusätzlich sind Pflanzenzellen und Kontrollsequenzen, die mit Pflanzenzellen kompatibel sind, wie z.B. der Blumenkohlmosaikvirus 35S und 19S und Nopalinsynthasepromoter und Polyadenylierungssignalsequenzen ebenfalls als Wirte verfügbar. Ein anderer bevorzugter Wirt ist eine Insektenzelle, wie z.B. die *Drosophila* Larve. Bei Verwendung von Insektenzellen als Wirte kann der *Drosophila*-Alkoholdehydrogenase-Promoter verwendet werden (Rubin, *Science* 240:1453, 1988). Alternativ können *Baculovirus*-Vektoren konstruiert werden, um große Mengen der Kinasen der Erfindung in Insektenzellen zu exprimieren (Jasny, *Science* 238:1653, 1987; Miller et al., In: *Genetic Engineering*, Vol. 8, Plenum, Setlow et al., eds., pp. 277-297, 1986).

**[0132]** Irgendeines aus einer Serie von Hefeexprimierungssystemen kann verwendet werden, welche die Promoter- und Terminationselemente aus den aktiv exprimierten Sequenzen, die für glykolytische Enzyme, die in großen Mengen hergestellt werden, wenn Hefe in Glucose-reichen Medien gezüchtet werden, kodieren, einfügen. Bekannte glykolytische Gensequenzen können ebenfalls sehr effiziente transkriptionale Kontrollsignale bereitstellen. Hefe stellt wesentliche Vorteile bereit, in dem sie ebenfalls posttranskriptionale Modifikationen durchführen kann. Eine Anzahl von rekombinaten DNA-Strategien existieren, die starke Promoter-Sequenzen und eine hohe Kopieranzahl von Plasmiden, die für die Herstellung der gewünschten Proteine in der Hefe verwendet werden können, verwenden. Hefe erkennt die Führungssequenzen bei geklonten Säugetiergenen und sekretiert Peptide, die Führungssequenzen tragen (d.h. Pre-peptide). Verschiedene mögliche Vektorsysteme sind für die Exprimierung der Kinase der Erfindung bei einem Säugetier-Wirt erhältlich.

**[0133]** Eine große Vielzahl von transkriptionalen und translationalen Regulatorsequenzen können verwendet werden, abhängig von der Natur des Wirts. Die transkriptionalen und translationalen Regulatorsignale können aus viralen Quellen, wie z.B. einem Adenovirus, Rind Papillomavirus, Cytomegalovirus, Simianvirus oder ähnliches, bei denen die Regulatorsignale mit einer bestimmten Gensequenz, die einen hohen Grad an Exprimierung hat, verbunden sind, abgeleitet werden. Alternativ können Promoter aus Säugetierexprimierungsprodukten, wie z.B. Actin, Collagen, Myosin und ähnliches verwendet werden. Transkriptionale Anfangsregulatorsignale können ausgewählt werden, die Repression und Aktivierung ermöglichen, so dass die Exprimierung der Gensequenzen moduliert werden kann. Von Interesse sind regulatorische Signale, die temperaturempfindlich sind, so dass durch Variieren der Temperatur Exprimierung unterdrückt oder gestartet werden kann oder sind Gegenstand chemischer Regulierung (wie z.B. Metabolite).

**[0134]** Exprimierung der Kinase der Erfindung in eukaryotischen Wirten erfordert die Verwendung von eukaryotischen Regulatorregionen. Diese Regionen werden im allgemeinen eine Promoter-Region enthalten, die ausreichend ist, um den Start der RNA-Synthese zu dirigieren. Bevorzugte eukaryotische Promoter beinhalten z.B. die Promoter der Mausmetallothionein I Gensequenz (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288, 1982); den TK-Promoter des Herpesvirus (McKnight, Cell 31:355-365, 1982); den SV40 Frühpromoter (Benoist et al., Nature (London) 290:304-31, 1981); und den Hefe ga14 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).

**[0135]** Translation von eukaryotischer mRNA wird an dem Codon, welches für das erste Methionin codiert, gestartet. Aus diesem Grund ist es bevorzugt, sicherzustellen, dass die Bindung zwischen einem eukaryotischen Promoter und einer DNA-Sequenz, die für eine Kinase der Erfindung (oder ein funktionelles Derivat davon) kodiert, keine Zwischencodons enthält, die für ein Methionin (d.h. AUG) kodieren können. Das Vorhandensein dieser Kodons resultiert entweder in der Bildung eines Fusionsproteins (wenn das AUG-Codon im selben Leserahmen wie die Kinase der erfindungsgemäßen Kodierungssequenz ist) oder einer Rahmen-Shift Mutation (wenn das AUG-Codon nicht in dem selben Leserahmen wie die Kinase der erfindungsgemäßen Kodierungssequenz ist).

**[0136]** Ein Nukleinsäuremolekül, das für die Kinase der Erfindung kodiert, und ein operabel verbundener Promoter können in eine prokaryotische oder eukaryotische Empfängerzelle entweder als ein nicht replizierendes DNA- oder RNA-Molekül, welches entweder ein lineares Molekül oder bevorzugt ein geschlossenes kovalentes zirkuläres Molekül ist, eingeführt werden. Da diese Moleküle keine autonome Replikation durchführen können, kann die Exprimierung des Gens durch die transiente Exprimierung der eingefügten Sequenz auftreten. Alternativ kann permanente Exprimierung durch die Integration der eingeführten DNA-Sequenz in das Wirtschromosom auftreten.

**[0137]** Ein Vektor kann verwendet werden, der die gewünschten Gensequenzen in das Wirtszellchromosom integrieren kann. Zellen, die die eingeführte DNA stabil in ihre Chromosome integriert haben, können ausgewählt werden, indem ebenfalls einer oder mehrere Marker eingeführt werden, die die Selektion der Wirtszellen, die den Exprimierungsvektor enthalten, erlauben. Der Marker kann Prototropie für einen auxotrophen Wirt, Biocidbeständigkeit, z.B. Antibiotika, oder Schwermetalle, wie z.B. Kupfer oder ähnliches, bereitstellen. Die wählbare Markergensequenz kann entweder direkt an die DNA Gensequenzen, die exprimiert werden sollen, gebunden werden oder in die gleiche Zelle durch Co-Transfektion eingeführt werden. Zusätzliche Elemente können ebenfalls für eine optimale Synthese von mRNA benötigt werden. Diese Elemente können Verbindungssignale als auch Transkriptionspromoter, Verstärker und Endsignale beinhalten. cDNA Exprimierungsvektoren, die diese Elemente einführen, beinhalten die von Okayama beschriebenen (Mol. Cell. Biol. 3:280-, 1983).

**[0138]** Das eingeführte Nukleinsäuremolekül kann in ein Plasmid oder einen viralen Vektor, der autonome Replikation in dem Empfängerwirt durchführen kann, eingefügt werden. Jeder einer Vielzahl von Vektoren kann für diesen Zweck verwendet werden. Faktoren von Wichtigkeit beim Auswählen eines bestimmten Plasmids oder viralen Vektors beinhaltet: die Leichtigkeit mit der die Empfängerzellen, die den Vektor enthalten, erkannt werden können und von diesen Empfängerzellen, die den Vektor nicht enthalten, ausgewählt werden können; die Anzahl der Kopien des Vektors, die in einem bestimmten Wirt benötigt werden; und ob es Wünschenswert ist, den Vektor zwischen Wirtszellen unterschiedlicher Spezies „pendeln“ zu können.

**[0139]** Bevorzugte prokaryotische Vektoren beinhalten Plasmide, wie z.B. die, die in *E. coli* replizieren können (wie z.B. pBR322, ColEl, pSC101, pACYC 184,  $\pi$ VX; „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, 1989, supra). *Bacillus* Plasmide beinhalten pC194, pC221, pT127 und ähnliches (Gryczan, in: The Molecular Biology Of the *Bacilli*, Academic Press, NY, S. 307-329, 1982). Geeignete *Streptomyces* Plasmide beinhalten pJ101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169:4177-4183, 1987), und *Streptomyces* Bakteriophagen wie z.B.  $\phi$ C31 (Chater et al., in: Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kaido, Budapest, Hungary, S. 45-54, 1986). *Pseudomonas* Plasmide werden von John et al. rezensiert (Rev. Infect. Dis. 8:693-704, 1986) und Izaki (Jpn. J. Bacteriol. 33:729-742, 1978).

**[0140]** Bevorzugte eukaryotische Plasmide beinhalten z.B. BPV, Vaccinia, SV40, 2-Mikron Kreis und ähnliche oder ihre Derivate. Diese 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, S. 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, S. 563-608, 1980).

**[0141]** Wenn der Vektor oder das Nukleinsäuremolekül, das die Konstruktion(en) enthält, einmal für Expressierung hergestellt wurde, kann die DNA-Konstruktion(en) in eine geeignete Wirtszelle durch irgendeine Vielzahl geeigneter Mittel, d.h. Transformation, Transfektion, Konjugation, Protoplast-Fusion, Elektroporation, Teilchenkanonentechnologie, Calciumphosphatausfällung, direkte Mikroinjektion und ähnliches, eingeführt werden. Nach der Einführung des Vektors werden die Empfängerzellen in einem ausgewählten Medium, das für das Wachstum der vektorhaltigen Zellen ausgewählt ist, gezüchtet werden. Expressierung des/der geklonnten Gens(e) resultiert in der Herstellung der Kinase der Erfindung oder von Fragmenten davon. Dies kann in den transformierten Zellen als solches stattfinden oder im Anschluss an die Induktion dieser Zellen sich aufzuteilen (z.B. durch Verabreichung von Bromodeoxyuracil an Neuroblastomzellen oder ähnliche). Eine Vielzahl von Inkubationsbedingungen kann verwendet werden, um das Peptid der vorliegenden Erfindung zu bilden. Die bevorzugtesten Bedingungen sind die, die physiologische Bedingungen imitieren.

#### IV. Die Proteine der Erfindung

**[0142]** Eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Methoden kann verwendet werden, um das Polypeptid der vorliegenden Erfindung zu erhalten. Das Polypeptid kann aus Geweben oder Zellen, die normalerweise das Polypeptid erzeugen, gereinigt werden. Alternativ könnten die oben beschriebenen isolierten Nukleinsäurefragmente verwendet werden, um die Kinase der Erfindung in irgendeinem Organismus zu exprimieren. Die Proben der vorliegenden Erfindung beinhalten Zellen, Proteinextrakte oder Membranextrakte von Zellen oder biologische Flüssigkeiten. Die Proben werden basierend auf dem Assay-Format, dem Bestimmungsverfahren und der Natur der Gewebe, Zellen oder Extrakte, die als die Probe verwendet werden, variieren.

**[0143]** Irgendein eukaryotischer Organismus kann als Quelle für das Polypeptid der Erfindung verwendet werden, solange die Organismusquelle natürlicherweise dieses Polypeptid enthält. Wie hier verwendet, betrifft „Organismusquelle“ den Original-Organismus, aus dem sich die Aminosäuresequenz der Untereinheit ableitet, wobei die Untereinheit unabhängig von dem Organismus darin exprimiert und ultimativ davon isoliert wird.

**[0144]** Der Durchschnittsfachmann kann leicht den bekannten Verfahren für die Isolierung von Proteinen folgen, um die Polypeptide, die frei von natürlichen Verunreinigungen sind, zu erhalten. Diese beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt: eine Größenexklusionschromatographie, HPLC, Ionen austauschchromatographie und Immuno-Affinitäts-Chromatographie.

#### Säugetier STLK2

**[0145]** Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz sagt voraus, dass STLK2 eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinase ist, der sowohl eine Signalsequenz als auch eine Transmembrandomain fehlt. STLK2 enthält eine N-endständige Domain mit 21 Aminosäuren, eine katalytische Domain mit 253 Aminosäuren mit all den Motiven, die für eine Serin-Threonin Kinase charakteristisch sind, gefolgt von einer C-endständigen Domain mit 142 Aminosäuren.

**[0146]** STLK2 betrifft am ehesten menschliche STE20-Unterfamilien Kinasen, MST3 (GB:AF024636) und SOK-1 (GB:X99325) und eine *C. elegans* Kinase yk34b11.5 (GB:U53153), die 72.7%, 68.7% bzw. 69.3% Aminosäureidentität teilen.

**[0147]** Die N-endständige Domain mit 21 Aminosäuren menschliches STLK2 ist zu 71.4% mit dem N-Ende von MST3 (GB:AF024636) identisch. Der menschlichen STLK2 fehlt ein Glycinrest an Position 2 und kann sich deshalb wahrscheinlich keiner Myristylation unterziehen. Eine Smith-Waterman-Suche der nicht redundanten Proteindatenbasis zeigt keinerlei signifikanten Homologien an, die eine potentielle Funktion für diese Domain vorschlagen könnten.

**[0148]** Die katalytische Domain mit 253 Aminosäuren menschlicher STLK2 betrifft am meisten menschliche SOK-1 (X99325), MST3 (GB:AF024636), *C. elegans* yk32b11.5 (GB:U53153), und STLK3, die 88.9%, 87.4%, 78.3% bzw. 49% Aminoidentität teilen, wobei sie diese in die STLK-Unterfamilie der STE20-verwandten Kinasen platziert. Die STLK2-Kinase-Domain zeigte weniger Homologie zu anderen STE20-verwandten Kinasen, einschließlich: 55.9% zu menschlichem MST2 (GB: U26424), 49.2% zu menschlichem GCK (GB: U07349), 49.2% zu menschlichem KHS1 (GB: U77129) und 44.2% zu menschlichem HPK1 (GB: U66464). Die Aktivierungsschleife der katalytischen Domain von menschlicher STLK2 ist identisch zur menschlichen SOK-1 und MST3, einschließlich des Vorhandenseins von vier potentiellen Threonin Phosphorelierungsseiten, die eine autoregulatorische Rolle bei der Kinaseaktivität spielen könnten.

**[0149]** Die C-Enddomain mit 142 Aminosäuren menschlicher STLK2 betrifft am meisten menschliche SOK-1 (X99325), MST3 (GB:AF024636) und *C. elegans* yk32b11.5 (GB:U53153), die 39.9%, 39.9% bzw. 33.3% Aminosäureidentität teilt. Diese C-Enddomain teilt eine signifikante Aminosäureähnlichkeit der C-Enddomains der verwandten menschlichen STLK3 und STLK4.

**[0150]** Das C-Ende der verwandten menschlichen SOK-1 Kinase (GB:X99325) hat gezeigt, dass es für die katalytische Aktivität dieser Kinase inhibitorisch ist (Pombo, C.M., Bonventre, J.V., Molnar, A., Kyriakis, J. und Force, T. EMBO J. 15, 4537-4546 (1996)). Basierend auf der Sequenzidentität zwischen dem C-Ende menschlichem SOK-1 (GB: X99325) und menschlichem STLK2 (39.2%) kann das C-Ende des menschlichen STLK2 ebenso als eine inhibitorische Domäne für dessen Kinase dienen.

V. Antikörper, Hybridome, Methoden der Verwendung und Kits zur Bestimmung von STE20-verwandten Kinassen

**[0151]** Die vorliegende Erfindung betrifft einen Antikörper mit Bindungsaffinität an die Kinase der Erfindung. Das Polypeptid kann die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 oder eines funktionellen Derivats davon oder wenigstens 9 aufeinanderfolgende Aminosäuren davon (bevorzugt wenigstens 20, 30, 35 oder 40 oder mehr aufeinanderfolgende Aminosäuren davon) haben.

**[0152]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls einen Antikörper mit spezifischer Bindungsaffinität an die Kinase der Erfindung. Dieser Antikörper kann durch Vergleichen seiner Bindungsaffinität an die Kinase der Erfindung mit seiner Bindungsaffinität an andere Polypeptide isoliert werden. Diejenigen, die selektiv an die Kinase der Erfindung binden, würden für die Verwendung bei Verfahren, die einen Unterschied zwischen der Kinase der Erfindung und anderen Polypeptiden erfordern, ausgewählt. Diese Verfahren könnten beinhalten, sollten aber nicht darauf beschränkt sein, die Analyse von veränderter Kinaseexprimierung in Gewebe, das andere Polypeptide enthält.

**[0153]** Die STE20-verwandte Kinase der vorliegenden Erfindung kann in einer Vielzahl von Prozessen und Verfahren, wie z.B. für die Erzeugung von Antikörpern, für die Verwendung bei der Identifizierung pharmazeutischer Zusammensetzungen und für das Studium der DNA/Proteinwechselwirkung, verwendet werden.

**[0154]** Die Kinase der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um Antikörper oder Hybridoma zu erzeugen. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass wenn ein Antikörper benötigt wird, ein solches Peptid wie hier beschrieben erzeugt werden kann und als ein Immunogen verwendet werden kann. Die Antikörper der vorliegenden Erfindung beinhalten monoklonale und polyklonale Antikörper, als auch Fragmente dieser Antikörper und humanisierte Formen. Humanisierte Formen der Antikörper der vorliegenden Erfindung können unter Verwendung von einem der im Stand der Technik bekannten Verfahren, wie z.B. die Chimerisation oder das CDR-Propfen, hergestellt werden.

**[0155]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Hybridom, das den oben beschriebenen monoklonalen Antikörper erzeugt oder Fragmente davon bindet. Ein Hybridom ist eine immortalisierte Zelllinie, die einen spezifischen monoklonalen Antikörper sekretieren kann.

**[0156]** Im allgemeinen sind Techniken zur Herstellung monoklonaler Antikörper und Hybridoma 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, Hase und ähnliches), das bekannt ist, Antikörper herzustellen, kann mit dem ausgewählten Polypeptid immunisiert werden. Verfahren zur Immunisierung sind im Stand der Technik gut bekannt. Diese Verfahren beinhalten subkutane oder intraperitoneale Injektion des Polypeptids. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass die Menge des Polypeptids, das für die Immunisierung verwendet wird, auf Basis des Tieres, das immunisiert ist, der Antigenizität des Polypeptids und der Injektionsseite variieren wird.

**[0157]** Das Polypeptid kann modifiziert werden oder in einem Hilfsstoff verabreicht werden, um die Peptidan antigenizität zu erhöhen. Verfahren zur Steigerung der Antigenizität eines Polypeptids sind im Stand der Technik gut bekannt. Diese Verfahren beinhalten das Koppeln des Antigens mit einem heterologen Protein (wie z.B. Globulin oder  $\beta$ -Galactosidase) oder durch den Einschluss eines Hilfsstoffs während der Immunisierung.

**[0158]** Für monoklonale Antikörper werden Milzzellen aus den immunisierten Tieren entfernt, mit Myeloma-Zellen, wie z.B. SP2/0-Agl4 Myelomazellen, fusioniert und können monoklonale Antikörper, die Hybrido-

ma-Zellen erzeugen, werden. Jedes einer Vielzahl von Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, kann verwendet werden, um die Hybridomazelle, die einen Antikörper mit den gewünschten Charakteristika erzeugt, zu identifizieren. Dies beinhaltet das Screenen der Hybridoma mit einem ELISA-Assay, Western-Plot-Analyse oder Radio-Immunoassay (Lutz et al., *Exp. Cell Res.* 175:109-124, 1988). Hybridoma, die die gewünschten Antikörper sekretieren, sind geklont und die Klasse und Unterklasse werden unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren bestimmt (Campbell, „Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", *supra*, 1984).

**[0159]** Für polyklonale Antikörper wird antikörperhaltiges Antiserum aus dem immunisierten Tier isoliert und nach dem Vorhandensein von Antikörpern mit der gewünschten Spezifität unter Verwendung eines der oben beschriebenen Verfahren gescreent. Die oben beschriebenen Antikörper können dedektierbar markiert sein. Antikörper können durch die Verwendung von Radioisotopen, Affinitätsmarkierungen (wie z.B. Biotin, Avidin und ähnliche), enzymatische Markierungen (wie z.B. Merrettich-Peroxidase), Alkaliphosphatase und ähnliches), Fluoreszenzmarkierungen (wie z.B. FITC oder Rhodamin und ähnliches), paramagnetische Atome und ähnliches dedektierbar markiert werden. Verfahren zur Ausführung dieser Markierungen sind im Stand der Technik gut bekannt, siehe z.B. Stemberger et al. *J. Histochem. Cytochem.* 18:315, 1970; Bayer et al., *Meth. Enzym.* 62:308-, 1979; Engyval et al., *Immunol.* 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.

**[0160]** Die oben beschriebenen Antikörper können ebenfalls auf einem festen Träger immobilisiert werden. Beispiele dieser festen Träger beinhalten Kunststoffe, wie z.B. Polycarbonat, komplexe Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Agarose und Sepharose, Acrylharze, wie z.B. Polyacrylamid und Latexkügelchen. Techniken zum Koppeln von Antikörpern an feste Träger sind im Stand der Technik gut bekannt (Weir et al., "Handbook of Experimental Immunology" 4<sup>th</sup> Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Kapitel 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 als auch bei Immunochromatographie verwendet werden.

**[0161]** Des Weiteren kann der Durchschnittsfachmann momentan erhältliche Verfahren, als auch die Techniken, Verfahren und Kits, die hier in Bezug auf Antikörper offenbart sind, leicht anpassen, um Peptide zu erzeugen, die an eine spezifische Peptidsequenz binden können, um vernünftig konstruierte Antipeptid-Peptide zu erzeugen (Hurby et al., "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", in *Synthetic Peptides, A User's Guide*, W.H. Freeman, NY, S. 289-307, 1992; Kaspaczak et al., *Biochemistry* 28:9230-9238, 1989).

**[0162]** Antipeptid-Peptide können durch Ersetzen der Grundaminosäurereste, die in den Peptidsequenzen der Kinase der Erfindung gefunden werden, durch saure Reste erzeugt werden, während hydrophobe und ungeladene polare Gruppen beibehalten werden. Zum Beispiel werden Lysin-, Arginin- und/oder Histidin-Reste durch Asparaginsäure oder Glutamatsäure ersetzt und Glutamatsäurereste werden durch Lysin, Arginin oder Histidin ersetzt.

**[0163]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls ein Verfahren zur Bestimmung eines STE20-verwandten Kinase-Polypeptids in einer Probe, das umfasst: (a) In-Kontakt-bringen der Probe mit einem oben beschriebenen Antikörper unter Bedingungen, so dass sich ein Immunokomplex bilden und (b) Bestimmen des Vorhandenseins des Antikörpers, der an das Polypeptid gebunden ist. Im Detail umfassen die Verfahren das Inkubieren einer Testprobe mit einem oder mehreren Antikörpern der vorliegenden Erfindung und das Untersuchen ob der Antikörper an die Testprobe bindet. Geänderte Niveaus der Kinase der Erfindung in einer Probe, verglichen mit normalen Niveaus, können eine Krankheit aufzeigen.

**[0164]** Bedingungen für die Inkubation eines Antikörpers mit einer Testprobe variieren. Inkubationsbedingungen hängen von den in dem Assay verwendeten Format, dem verwendeten Detektionsverfahren und der Art und Natur des in dem Assay verwendeten Antikörpers ab. Der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass irgendeines der herkömmlich erhältlichen immunologischen Assay-Formate (wie z.B. Radioimmunoassays, Enzym-verbundene Immunosorbent Assays, auf Diffusion basierendes Ouchterlony oder Rocket Immunofluoreszenz Assays) leicht angepasst werden kann, um die Antikörper der vorliegenden Erfindung zu verwenden. Beispiele dieser Assays können bei 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), Tijssen ("Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1985) gefunden werden.

**[0165]** Die immunologischen Assay-Testproben der vorliegenden Erfindung beinhalten Zellen, Proteine oder Membranextrakte von Zellen oder biologische Flüssigkeiten, wie z.B. Blut, Serum, Plasma oder Urin. Die in dem oben beschriebenen Verfahren verwendeten Testproben werden basierend auf dem Assay-Format, der Natur des Bestimmungsverfahrens und der Gewebe, Zellen oder Extrakte, die als die Probe, die untersucht werden soll, verwendet werden, variieren. Verfahren zur Herstellung von Proteinextrakten oder Membranextrakten von Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt und können leicht angepasst werden, um eine Probe, die mit dem verwendeten System untersuchbar ist, zu erhalten.

**[0166]** Ein Kit enthält alle notwendigen Reagenzien, um die zuvor beschriebenen Verfahren der Detektion auszuführen. Das Kit kann umfassen: (i) ein erstes Behältermittel, das einen oben beschriebenen Antikörper enthält und (ii) ein zweites Behältermittel, das ein Konjugat enthält, das einen Bindungspartner des Antikörpers und eine Markierung umfasst. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann das Kit des Weiteren einen oder mehrere andere Behälter umfassen, die eines oder mehrerer der folgenden umfassen: Waschreagenzien und Reagenzien, die das Vorhandensein eines gebundenen Antikörpers bestimmen können.

**[0167]** Beispiele für Detektionsreagenzien beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, markierte sekundäre Antikörper oder alternativ, wenn der primäre Antikörper markiert ist, die chromophoren, enzymatischen oder antikörperbindenden Reagenzien, die mit dem markierten Antikörper reagieren können. Der in Abteilungen aufgeteilte Kit kann wie oben beschrieben für Nukleinsäuresonde-Kits sein. Der Durchschnittsfachmann wird leicht erkennen, dass die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Antikörper leicht in eines der eingeführten Kitformate, die alle im Stand der Technik gut bekannt sind, eingefügt werden kann.

#### VI. Isolierung von Verbindungen, die mit STE20-verwandten Kinasen wechselwirken

**[0168]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Bestimmung einer Verbindung, die an die STE20-verwandte Kinase der Erfindung binden kann, wobei es das Inkubieren der Verbindung mit der Kinase der Erfindung und das Bestimmen des Vorhandenseins der Verbindung, die an die Kinase gebunden ist, umfasst. Die Verbindung kann in einer Komplexmischung, z.B. Serum, Körperflüssigkeit oder Zellextrakte, vorliegen.

**[0169]** Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Bestimmung eines Agonisten oder Antagonisten mit Kinaseaktivität oder Kinasebindungs合伙aktivität, das das Inkubieren der Zellen, die die Kinase der Erfindung herstellen, in Gegenwart einer Verbindung und das Bestimmen der Veränderung in dem Niveau der Kinaseaktivität oder Kinasebindungs合伙aktivität umfasst. Die somit identifizierten Verbindungen würden eine Veränderung in der Aktivität erzeugen, die für das Vorhandensein der Verbindung hinweisend ist. Die Verbindung kann in einer Komplexmischung, z.B. Serum, Körperflüssigkeit oder Zellextrakte vorliegen. Wenn die Verbindung einmal identifiziert ist, kann sie unter Verwendung von im Stand der Technik gut bekannter Techniken isoliert werden.

**[0170]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls ein Verfahren zum Agonisieren (Stimulieren) oder Antagonisieren von Kinaseverbundener Aktivität in einem Säugetier, das die Verabreichung eines Agonisten oder Antagonisten zu der Kinase der Erfindung in einer Menge, die ausreicht, um Agonismus oder Antagonismus zu bewirken, an ein Säugetier umfasst. Ein Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen in einem Säugetier mit einem Agonisten oder Antagonisten mit STE20-verwandter Kinaseaktivität, das die Verabreichung des Agonisten oder Antagonisten an das Säugetier in einer Menge, die ausreicht, um die STE20-verwandten Kinase-verbundenen Funktionen zu agonisieren oder antagonisieren, ist ebenfalls in der vorliegenden Anmeldung umfasst.

**[0171]** Bei Anstrengungen, neue Behandlungen für Erkrankungen zu entdecken, haben biomedizinische Forscher und Chemiker Moleküle entworfen, synthetisiert und getestet, die die Funktion von Proteinkinasen inhibieren. Einige kleine organische Moleküle bilden eine Klasse von Verbindungen, die die Funktion der Proteinkinasen modulieren. Beispiele für Moleküle, die die Funktion von Proteinkinasen inhibieren sollen beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, bismonocyclische, bicyclische oder heterocyclische Arylverbindungen (PCT WO 92/20642, veröffentlicht am 26. November 1992 von Maguire et al.), Vinylen-Azaindolderivative (PCT WO 94/14808, veröffentlicht am 07. Juli 1994 von Ballinari et al.), 1-Cyclopropyl-4-pyridyl-chinole (U.S. Patent No. 5,330,992), Styrolverbindungen (U.S. Patent No. 5,217,999), Styrol-substituierte Pyridylverbindungen (U.S. Patent No. 5,302,606), bestimmte Chinazolinderivate (EP Anmeldung Nr. 0 566 266 A1), Seleoindole und Selenide (PCT WO 94/03427, veröffentlicht am 17. Februar 1994 von Denny et al.), tricyclische Polyhydroxylverbindungen (PCT WO 92/21660, veröffentlicht am 10. Dezember 1992 von Dow) und Benzylphosphonsäureverbindungen (PCT WO 91/15495, veröffentlicht am 17. Oktober 1991 von Dow et al.).

**[0172]** Verbindungen, die Zellmembranen durchqueren und resistent gegenüber saurer Hydrolyse sind, sind potentiell vorteilhaft als Therapeutika, da sie eine hohe Bioverfügbarkeit haben, nachdem sie oral an Patienten verabreicht worden sind. Viele dieser Proteinkinaseinhibitoren inhibieren jedoch die Funktion von Proteinkinasen nur schwach. Zusätzlich inhibieren viele eine Vielzahl von Proteinkinasen und werden zahlreiche Nebeneffekte als Therapeutika für Erkrankungen verursachen.

**[0173]** Einige Indolinon-Verbindungen bilden jedoch Klassen von säureresistenten und Membran-durchlässigen organischen Molekülen. WO 96/22976 (veröffentlicht 01. August 1996 von Ballinari et al.) beschreibt wasserlösliche Indolinon-Verbindungen, die Tetralin-, Naphtalin-, Chinolin- oder Indol-Substituenten, die an den Oxindol-Ring gebunden sind, beherbergen. Diese bicyclischen Substituenten sind im Gegensatz dazu mit polaren Einheiten, die hydroxyliertes Alkyl, Phosphat- und Ethereinheiten beinhalten, substituiert. Die US-Patentanmeldungen Serien-Nummern 08/702,232, eingereicht am 23. August 1996, mit dem Titel „Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Disease“ von Tang et al. (Lyon & Lyon Aktennummer 221/187) und 08/485,323, eingereicht am 07. Juni 1995, mit dem Titel „Benzylidene-Z-Indolinone Compounds for the Treatment of Disease“ von Tang et al (Lyon & Lyon Aktennummer 223/298) und die Internationale Patentanmeldung WO 96/22976, veröffentlicht am 01. August 1996 von Ballinari et al., einschließlich aller Zeichnungen, beschreiben chemische Indolinon-Bibliotheken von Indolinon-Verbindungen, die andere bicyclische Einheiten als auch monocyclische Einheiten, die an den Oxindol-Ring gebunden sind, beherbergen. Die Anmeldungen 08/702,232, eingereicht am 23. August 1996, mit dem Titel „Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Disease“ von Tang et al. (Lyon & Lyon Aktennummer 221/187), 08/485,323, eingereicht am 07. Juni 1995, mit dem Titel „Benzylidene-Z-Indolinone Compounds for the Treatment of Disease“ von Tang et al. (Lyon & Lyon Akten-Nr. 223/298) und WO 96/22976, veröffentlicht am 01. August 1996 von Ballinari et al. Lehren über Verfahren von Indolinon-Synthesen, Verfahren zum Testen der biologischen Aktivität von Indolinon-Verbindungen in Zellen und die Inhibitionsmuster von Indolinon-Derivaten.

**[0174]** Andere Beispiele von Substanzen, die Kinase-Aktivität modulieren können, beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Tyrphostine, Chinazoline, Chinoxoline und Chinoline. Die Chinazoline, Tyrphostine, Chinoline und Chinoxoline, auf die oben Bezug genommen wird, beinhalten gut bekannte Verbindungen, wie die in der Literatur beschriebenen. Repräsentative Veröffentlichungen, die Chinazoline beschreiben, beinhalten zum Beispiel Barker et al., EPO Veröffentlichungsnr. 0 520 722 A1; Jones et al., U.S. Patent Nr. 4,447,648; Kabbe et al., U.S. Patent Nr. 4,757,072; Kaul und Vougioukas, U.S. Patent Nr. 5,316,553; Kreighbaum und Comer, U.S. Patent Nr. 4,343,940; Pegg und Wardleworth, EPO Veröffentlichungsnr. 0 562 734 A1; Barker et al., Proc. of Am. Assoc. for Cancer Research 32:327 (1991); Bertino, J.R., Cancer Research 3:293-304 (1979); Bertino, J.R. Cancer Research 9 (2 part 1):293-304 (1979); Curtin et al., Br. J. Cancer 53:361-368 (1986); Fernandes et al., Cancer Research 43:1117-1123 (1983); Ferris et al. J. Org. Chem. 44(2):173-178; Fry et al., Science 265:1093-1095 (1994); Jackman et al., Cancer Research 51:5579-5586 (1981); Jones et al. J. Med. Chem. 29(6):1114-1118; Lee und Skibo, Biochemistry 26(23):7355-7362 (1987); Lemus et al., J. Org. Chem. 54:3511-3518 (1989); Ley und Seng, Synthesis 1975:415-522 (1975); Maxwell et al., Magnetic Resonance in Medicine 17:189-196 (1991); Mini et al., Cancer Research 45:325-330 (1985); Phillips und Castle, J. Heterocyclic Chem. 17(19):1489-1596 (1980); Reece et al., Cancer Research 47(11):2996-2999 (1977); Sculier et al., Cancer Immunol. and Immunother. 23:A65 (1986); Sikora et al., Cancer Letters 23:289-295 (1984); Sikora et al., Analytical Biochem. 172:344-355 (1988).

**[0175]** Chinoxaline wurden von Kaul und Vougioukas, U.S. Patent Nr. 5,316,553 beschrieben.

**[0176]** Chinoline werden von Dolle et al., J. Med. Chem. 37:2627-2629 (1994); MaGuire, J. Med. Chem. 37:2129-2131 (1994); Burke et al., J. Med. Chem 36:425-432 (1993); und Burke et al. BioOrganic Med. Chem. Letters 2:1771-1774 (1992) beschrieben.

**[0177]** Tyrphostine werden von Allen et al., Clin. Exp. Immunol. 91:141-156 (1993); Anafi et al., Blood 82:12:3524-3529 (1993); Baker et al., J. Cell Sci 102:543-555 (1992); Bilder et al., Amer. Physiol. Soc. S. 6363-6143:C721-C730 (1991); Brunton et al., Proceedings of Amer. Assoc. Cancer Rsch. 33:558 (1992); Bryckaert et al., Experimental Cell Research 199:255-261 (1992); Dong et al., J. Leukocyte Biology 53:53-60 (1993); Dong et al., J. Immunol. 151(5):2717-2724 (1993); Gazit et al., J. Med. Chem. 32:2344-2352 (1989); Gazit et al., J. Med. Chem. 36:3556-3564 (1993); Kaur et al., Anti-Cancer Drugs 5:213-222 (1994), King et al., Biochem. J. 275:413-418 (1991); Kuo et al., Cancer Letters 74:197-202 (1993); Levitzki, A., The FRSEB J. 6:3275-3282 (1992); Lyall et al., J. Biol. Chem. 264:14503-14509 (1989); Peterson et al., The Prostate 22:335-345 (1993); Pillemeyer et al., Int. J. Cancer 50:80-85 (1992); Posner et al., Molecular Pharmacology 45:673-683 (1993); Rendu et al., Biol. Pharmacology 44(5):881-888 (1992); Sauro und Thomas, Life Sciences

53:371-376 (1993); Sauro und Thomas, J. Pharm. and Experimental Therapeutics 267(3):119-1125 (1993); Wolbring et al., J. Biol. Chem. 269(36):22470-22472 (1994); und Yoneda et al., Cancer Research 51:4430-4435 (1991) beschrieben.

**[0178]** Andere Verbindungen, die als Modulatoren verwendet werden können, beinhalten Oxindolinone, wie z.B. die, die in der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/702,232, die am 23. August 1996 eingereicht wurde, beschrieben sind.

#### VII. Biologische Signifikanz, Anwendungen und klinische Relevanz neuer STE20-verwandter Kinasen von menschlichem STLK2

**[0179]** STLK2 gehört zu einer sich ausdehnenden Familie intrazellulärer STKs, die einen variierenden Grad an Sequenzhomologie zu SOK-1, einer Kinase, die mit oxidativen Stressagenzien verbunden ist (Pombo, CM et al, EMBO J. (17) 4537-4546, 1996), haben. Unsere Daten zeigen, dass STLK2 in hematopoetischen Zellen stark exprimiert wird. Deshalb kann STLK2 beim oxidativen Antwortweg während der Entzündung teilnehmen. Zusätzlich könnte STLK2 ebenfalls eine mögliche Verbindung bei Signalwegen, die zur T-Zellenaktivierung führen, sein. Hohe Niveaus an STLK2 in verschiedenen Tumorzelllinien könnten ebenfalls andeuten, dass STLK2 in Tumoregulierung involviert ist.

**[0180]** STLK2 betrifft am meisten zwei menschliche STE20-Unterfamilien-Kinasen: MST3 und SOK-1. MST3 ist eine cytoplasmatische Kinase mit 52.000 Daltons, die überall exprimiert wird, wobei ihre höchsten Niveaus an Exprimierung im Herzen, der Skelettmuskulatur und der Bauchspeicheldrüse gefunden werden. Die Serin/Threonin Kinase-Aktivität von MST3 wird durch Phosphorylierung aktiviert. Anders als SOK-1 bevorzugt MST3 Mn<sup>++</sup> gegenüber Mg<sup>++</sup> und kann sowohl als GTP als auch ATP als Phosphatdonor verwendet werden. MST3 kann sich einer Dimerisierung unterziehen. Keine Agonisten sind bis jetzt identifiziert worden, die MST3 aktivieren. Der Stromabwärts-Signalmechanismus dieser Kinase ist unbekannt (Schinkmann, K und Blenis, J. (1997), J. Biol. Chem. 272, 28695-28703).

**[0181]** SOK-1 ist eine cytoplasmatische Kinase mit 50.000 Daltons, die vorwiegend in Testis, größtenteils im Darm, Gehirn und Magen und in geringerem Maße im Herz und in der Lunge exprimiert wird. SOK-1 wird ebenfalls in der germlinalen Center-B-Zelllinie (RAMOS) und einer reifen B-Zelllinie (HS Sultan) exprimiert. Die Serin/Threonin Kinase-Aktivität von SOK-1 wird durch Phosphorylierung aktiviert. Das C-Ende von SOK-1 hat sich als inhibitorisch für die katalytische Aktivität dieser Kinase gezeigt. Die einzigen Agonisten, von denen bekannt ist, dass sie SOK-1 aktivieren, sind Oxidationsmittel, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Menadion, ein Chinon, das ein potenter intrazellulärer Generator von reaktiven Sauerstoffspezies ist (Pombo, C.M. et al. EMBO J. 15, 4537-4546). SOK-1 wird ebenfalls durch chemische Anoxie durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Freisetzung von Calcium in das Cytoplasma von intrazellulären Lagern aktiviert. SOK-1 kann deshalb eine wichtige Rolle bei Ischemie, der Ursache von Myocardialinfarkt, Schlaganfall und akutem Nierenversagen spielen (Pombo, C.M. et al. J. Biol. Chem. 272, 29372-29379 (1997)). Die Aktivität von SOK-1 bei der Antwort auf oxidativen Stress ist umgekehrt mit der Aktivität der stressaktivierenden Proteinkinasen (SAPKs) verbunden: gesteigerte SOK-1-Aktivität korreliert mit der Abwesenheit von SAPK-Aktivität und umgekehrt. SOK-1 aktiviert keinen der vier MAP-Kinasewege, SAPKs, p38, ERK-1 oder MEK-5/ERK-5 (Pombo, C.M. et al. EMBO J. 15, 4537-4546). Der Stromabwärts-Signalmechanismus dieser Kinase bleibt unbekannt.

**[0182]** STLK2 wird in einer großen Vielzahl von Immunzelltypen und Geweben, einschließlich Thymus, Dendrozyten, Mastzellen, Monozyten, B-Zellen (primär, Jurkat, RPMI, SR), T-Zellen (CD8/CD4+, TH1, TH2, CEM, MOLT4) und Megakaryozyten (K562) exprimiert. Konsequenterweise kann dieses STK bei oxidativen Antwortwegen während Entzündungen, Reperfusionsverletzungen (Schlaganfall, chirurgische Behandlung, Schock), TNF $\alpha$ -vermittelte Signale, Insulin-Desensibilisierung, Atherogenese, vaskuläre Verletzung, T- oder B-Zellen-Co-Stimulation teilnehmen oder alternativ bei anderen MAPK-verwandten Signalübertragungsverfahren teilnehmen.

**[0183]** Der hohe Grad an Sequenzhomologie bei dem C-Ende von SOK-1 und STLK2 drängt die Möglichkeit auf, dass dieses neue STK, wie z.B. SOK-1, Gegenstand von Autoinhibierung durch ein konserviertes C-Endomotiv sein kann.

## Klinische Anwendungen

## Menschliches STLK2

**[0184]** Homologe der STLK Unterfamilie von STE20 Proteinkinasen, wie z.B. STLK4, können eine wichtige Rolle als Mediatoren der Immunantwort spielen. Somit sind sie Targets für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren kleiner Moleküle, um immunologische Erkrankungen, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, rheumatoide Arthritis, chronische entzündliche Magenerkrankungen (z.B. Crohn's Erkrankung), chronische entzündliche Beckenerkrankungen, multiple Sklerose, Asthma, Osteoarthritis, Psoriasis, Atherosclerose, Rhinitis und Autoimmunität, zu behandeln, als auch bei organischen Transplantationen. Andere Erkrankungen beinhalten kardiovaskuläre Erkrankungen.

**[0185]** Die menschlichen STLKs können ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums spielen. Somit sind sie Targets für die Entwicklung von Kinase Inhibitoren kleiner Moleküle für die Behandlung von Krebs und Metastasen.

**[0186]** Die potentielle Rolle von menschlichem STLK2 bei der Vermittlung von oxidativem Stress deutet stark darauf hin, dass Arzneimittel, die diese Kinase als Target haben, sich ebenso bei der Behandlung von Myocardialinfarkt, Arrhythmie und anderen Kardiomyopathien, Schlaganfall, Nierenversagen, mit oxidativem Stress verbundenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. amyothropisches Lateralsklerose, Parkinsons' Erkrankung und Leigh-Syndrom, einer nekrotisierende mitochondriale Encophalopathie, als nützlich erweisen können.

## VIII. Transgene Tiere

**[0187]** Eine Vielzahl von Verfahren sind für die Herstellung von transgenen Tieren, die mit dieser Erfindung verbunden sind, erhältlich. DNA kann in den Pronucleus eines befruchteten Eis vor der Verschmelzung der männlichen und weiblichen Pronuclei injiziert werden oder kann in den Kern einer embryonischen Zelle (z.B. der Kern eines zweizelligen Embryos) im Anschluß an den Start der Zellteilung injiziert werden (Brinster et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442, 1985). Embryonen können mit Viren infiziert werden, insbesondere Retroviren, die modifiziert sind, um anorganische Ionenrezeptor-Nukleotidsequenzen der Erfindung zu tragen.

**[0188]** Pluripotente Stammzellen, die sich von der inneren Zellmasse des Embryos ableiten und in Kultur stabilisiert sind, können in Kultur manipuliert werden, um Nukleotidsequenzen der Erfindung einzuführen. Ein transgenes Tier kann aus solchen Zellen durch Implantierung eines Blastozysten, der in eine Fostermutter implantiert wird und gedeihen soll, hergestellt werden. Tiere, die für transgene Experimente geeignet sind, können aus Standard-kommerziellen Quellen, wie z.B. Charles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY), Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN) etc. erhalten werden.

**[0189]** Die Verfahren zur Manipulierung vom Nagetierembryo und zur Mikroinjektion von DNA in den Pro-Nucleus der Zygote sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt (Hogan et al., supra). Mikroinjektionsverfahren für Fische, amphibische Eier und Vögel sind bei Houdebine und Chourrot detailliert erläutert (Experientia 47:897-905, 1991). Andere Verfahren zur Einführung von DNA in Gewebe von Tieren sind im US-Patent Nr. 4,945,050 (Sandford et al., 30. Juli, 1990) beschrieben.

**[0190]** Nur beispielhaft werden weibliche Mäuse zu einem Superovulat gebracht, um eine transgene Maus zu erzeugen. Weibchen werden mit Männchen zusammengebracht und die gepaarten Weibchen werden mit CO<sub>2</sub>, Asphyxiation oder zervikaler Dislokation geopfert und die Embryos werden aus dem ausgeschiedenen Ovidukten wiedergewonnen. Umgebenden Kumulus-Zellen werden entfernt. Embryos mit Pro-Kern werden dann gewaschen und gelagert, bis zum Zeitpunkt der Injektion. Zufällig cyclisierende erwachsene weibliche Mäuse werden mit vasektomisierten Männchen gepaart. Empfängerweibchen werden zur selben Zeit als Donor-Weibchen gepaart. Die Embryos werden dann operativ entfernt. Das Verfahren zur Erzeugung transgener Ratten ist dem von Mäusen ähnlich (Hammer et al., Cell 63:1099-1112, 1990).

**[0191]** Verfahren zur Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES) und die folgende Herstellung von transgenen Tieren durch die Einführung von DNA in ES-Zellen unter Verwendung von Verfahren wie z.B. Elektroporation, Calciumphosphat/DNA-Ausfällung und direkte Injektion sind dem Durchschnittsfachmann ebenfalls gut bekannt (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach, E.J. Robertson, ed., IRL Press, 1987).

**[0192]** Für den Fall, der zufällige Genintegration involviert, wird ein Klon, der die Sequenz(en) der Erfindung enthält, mit einem Gen, das für Widerstand kodiert, transfiziert. Alternativ wird das Gen, das für Neomycin-Widerstand kodiert, physikalisch an die Sequenz(en) der Erfindung gebunden. Transfektion und Isolierung von gewünschten Klonen werden durch eines von mehreren Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann gut bekannt sind, durchgeführt (E.J. Robertson, *supra*).

**[0193]** DNA-Moleküle, die in ES-Zellen eingeführt wurden, können ebenfalls in das Chromosom durch das Verfahren der homologen Rekombination integriert werden (Capecchi, *Science* 244:1288-1292, 1989). Verfahren zur positiven Auswahl des rekombinanten Ereignisses (d.h. Neo-Widerstand) und der zweifache positiv-negativ-Auswahl (d.h. Neowiderstand und Gancyclovir-Widerstand) und die folgende Identifizierung der gewünschten Klone durch PCR sind von Capecchi, *supra* und Joyner et al. (*Nature* 338:153-156, 1989) beschrieben worden. Die Endphase des Verfahrens ist es, Target-ES-Zellen in Blastozysten zu injizieren und die Blastozysten in pseudoschwangere Weibchen zu transferieren. Die resultierenden chimeren Tiere werden gebrütet und der Beginn wird durch Southern Blotting analysiert, um die Individuen, die das Transgen tragen, zu identifizieren. Verfahren für die Herstellung von Nichtnagetier-Säugetieren und anderen Tieren ist von anderen diskutiert worden (Houdebine und Chourrout, *supra*; Pursel et al., *Science* 244:1281-1288, 1989; und Simms et al., *Bio/Technology* 6:179-183, 1988).

**[0194]** Somit stellt die Erfindung transgene, nicht-menschliche Säugetiere bereit, die ein Transgen, das für die Kinase der Erfindung kodiert, oder ein Gen, das die Exprimierung der Kinase beeinflusst, enthalten. Diese transgenen nicht-menschlichen Säugetiere sind besonders verwendbar als ein in vivo Testsystem für das Studium der Wirkungen der Einführung einer Kinase oder der Regulierung der Exprimierung einer Kinase (d.h. durch die Einführung von zusätzlichen Genen, Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozymen).

**[0195]** Ein „transgenes Tier“ ist ein Tier mit Zellen, die DNA enthalten, die künstlich in die Zelle eingeführt wurden, wobei die DNA Teil des Genoms des Tieres, das sich aus der Zelle entwickelt, wird. Bevorzugte transgene Tiere sind Primaten, Mäuse, Ratten, Kühe, Schweine, Pferde, Ziegen, Schafe, Hunde und Katzen. Die transgene DNA kann für menschliches STLK2 kodieren. Ursprüngliche Exprimierung in einem Tier kann durch Bereitstellen einer Menge von Anti-Sense RNA oder DNA, die die Exprimierung des Rezeptors wirksam verringert, verringert werden.

## IX. Gentherapie

**[0196]** STLK2 oder dessen genetische Sequenzen werden ebenfalls bei der Gentherapie verwendbar sein (rezensiert von Miller, *Nature* 357:455-460, 1992). Miller behauptet, dass Fortschritte bei praktischen Versuchen bei menschlicher Gentherapie erzielt worden sind, die positive Anfangsergebnisse gezeigt haben. Die grundsätzliche Wissenschaft der Gentherapie wird bei Mulligan beschrieben (*Science* 260:926-931, 1993).

**[0197]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Exprimierungsvektor, der die STLK2-Kodierungssequenz enthält, in Zellen eingefügt, die Zellen werden *in vitro* gezüchtet und dann in eine große Anzahl von Patienten eingeführt. Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein DNA-Segment, das einen Promoter der Wahl (z.B. einen starken Promoter) enthält, in Zellen, die ein endogenes Gen, das für die Kinase der Erfindung kodiert, auf eine solche Art und Weise transferiert, dass das Promoter-Segment in die Exprimierung des endogenen Kinase-Gens verstärkt (z.B. wird das Promoter-Segment zu der Zelle transferiert, so dass es direkt mit dem endogenen Kinase-Gen verbunden wird).

**[0198]** Die Gentherapie kann die Verwendung eines Adenovirus, der Kinase cDNA enthält, die auf einen Tumor gerichtet ist, eines systemischen Kinaseanstieg, der auf die Implantierung von bearbeiteten Zellen gerichtet ist, die Injektion mit Kinase kodierenden Viren oder die Injektion von nackter Kinase DNA in geeignetes Gewebe beinhalten.

**[0199]** Target-Zellen Populationen können durch Einführen veränderter Formen von einer oder mehreren Komponenten der Proteinkomplexe modifiziert werden, um die Aktivität dieser Komplexe zu modulieren. Zum Beispiel kann durch Reduzieren oder Inhibieren einer Komplexkomponentenaktivität innerhalb der Target-Zellen ein abnormales Signalweitergabeereignis, das zu einer Bedingung führt, verringert, inhibiert oder umgekehrt werden. Die Entfernung oder die falsche Wahrnehmung von Mutanten einer Komponente, die die Fähigkeit mit anderen Komponenten der Proteinkomplexe wechsel zu wirken beibehält, aber nicht als Signalweitergabe fungieren kann, kann verwendet werden, um ein abnormales, verschlechterndes Signalweitergabeereignis zu inhibieren.

**[0200]** Die Exprimierung von Vektoren, die sich aus Viren ableiten, wie z.B. Retroviren, Vaccinavirus, Adenovirus, Adenoverbundene Viren, Herpesviren, verschiedene RNA-Viren oder Rind Papilloma Virus können zur Abgabe der Nukleotidsequenzen (z.B. cDNA), die für die rekombinante Kinase des Erfindungsproteins kodieren, in die Target-Zellen-Population (z.B. Tumorzellen) verwendet werden. Verfahren, die dem Durchschnittsfachmann gut bekannt sind, können verwendet werden, um rekombinante virale Vektoren herzustellen, die die Kodierungssequenzen enthalten (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Alternativ können rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die für Proteinsequenzen kodieren, als nackte DNA oder in einem wiederhergestellten System, z.B. Liposome oder andere Lipidsysteme zur Abgabe der Target-Zellen, verwendet werden (z.B. Felgner et al., Nature 337:387-8, 1989) verwendet werden. Verschiedene andere Verfahren für den direkten Transfer von Plasmid-DNA in Zellen existiert für die Verwendung bei der menschlichen Gentherapie und beinhaltet das Abzielen auf DNA auf Rezeptoren auf Zellen durch Komplexieren der Plasmid-DNA an Proteine (Miller, supra).

**[0201]** In seiner einfachsten Form kann der Gentransfer durch einfaches Injizieren geringer Mengen von DNA in den Kern einer Zelle durch ein Verfahren der Mikroinjektion durchgeführt werden (Capechi, Cell 22:479-88, 1980). Wenn die rekombinanten Gene einmal in eine Zelle eingeführt sind, können sie durch den normalen Mechanismus der Zelle für Transkription und Translation erkannt werden und ein Genprodukt wird exprimiert werden. Andere Verfahren sind ebenfalls zum Einführen von DNA in größeren Anzahlen in Zellen versucht worden. Diese Verfahren beinhalten: die Transfektion, wobei DNA mit  $\text{CaPO}_4$  ausgefällt wird und durch Pinocytose in Zellen aufgenommen wird (Chen et al., Mol. Cell Biol. 7:2745-52, 1987); Elektroporation, wobei Zellen starken Voltimpulsen ausgesetzt werden, um Löcher in die Membran einzuführen (Chu et al., Nucleic Acids Res. 15:1311-26, 1987); Lipofektions-/Liposomfusion, wobei DNA in lipophile Vesikel gepackt werden, die mit einer Target-Zelle fusionieren (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7413-7417, 1987) und Teilchenbombardement unter Verwendung von DNA, die an kleine Projektilen gebunden ist (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9568-9572, 1990). Ein anderes Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen ist es, die DNA an chemisch modifizierte Proteine zu koppeln.

**[0202]** Es hat sich ebenfalls gezeigt, dass Adenovirus-Proteine Endosome destabilisieren können und die Aufnahme von DNA in Zellen steigern können. Die Mischung von Adenovirus in Lösungen, die DNA-Komplexe enthalten, oder das Binden von DNA am Polylysin, das kovalent an Adenovirus angebunden ist, unter Verwendung von Protein-vernetzende Agenzien verbessert substantiell die Aufnahme und Exprimierung des rekombinanten Gens (Curiel et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 6:247-52, 1992).

**[0203]** Wie hier verwendet bedeutet "Gentransfer" das Verfahren des Einführens eines fremden Nukleinsäuremoleküls in eine Zelle. Gentransfer wird gewöhnlich durchgeführt, um die Exprimierung eines bestimmten Produktes, das für das Gen kodiert, zu ermöglichen. Das Produkt kann ein Protein, Polypeptid, Anti-Sense DNA oder RNA oder enzymatisch aktive RNA enthalten. Gentransfer kann in kultivierten Zellen oder durch direkte Verbreichung an Tiere durchgeführt werden. Im allgemeinen beinhaltet Gentransfer das Verfahren des Nukleinsäurekontaktees mit einer Target-Zelle durch nichtspezifische oder Rezeptor-vermittelte Wechselwirkungen, die Aufnahme von Nukleinsäure in die Zelle durch die Membran oder durch Endozytose und die Freisetzung von Nukleinsäure in das Zytosol aus der Plasmamembran oder dem Endosom. Die Exprimierung kann zusätzlich die Bewegung der Nukleinsäure in dem Kern der Zelle und das Binden der geeigneten Kernfaktoren für Transkription erfordern.

**[0204]** Wie hier verwendet ist „Gentherapie“ eine Form des Gentransfers und ist in der Definition von Gentransfer, wie hier verwendet, beinhaltet und betrifft insbesondere Gentransfer, um ein therapeutisches Produkt aus einer Zelle in vivo oder in vitro zu exprimieren. Gentransfer kann ex vivo auf Zellen, die dann in einen Patienten transplantiert werden, durchgeführt werden oder kann durch direkte Verabreichung der Nukleinsäure oder des Nukleinsäureproteinkomplexes an den Patienten durchgeführt werden.

**[0205]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein Vektor mit Nukleinsäuresequenzen, die für ein STLK2 Polypeptid kodieren, bereitgestellt, bei dem die Nukleinsäuresequenz nur in spezielle Gewebe exprimiert wird. Verfahren zum Erreichen der gewebespezifischen Genexprimierung werden in der Internationalen Anmeldung Nr. WO 93/09236, eingereicht am 03. November 1992 und veröffentlicht am 13. Mai 1993, gezeigt.

**[0206]** Bei all den vorher genannten Vektoren, die oben gezeigt sind, ist ein weiterer Aspekt der Erfindung der, dass die Nukleinsäuresequenz, die in dem Vektor enthalten ist, Zusätze, Löschungen oder Modifikationen von einigen oder allen Sequenzen der Nukleinsäure, wie oben definiert, beinhalten können.

**[0207]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Generierung gezeigt. „Generierung“, wie hier verwendet, bedeutet Liefern einer Nukleinsäuresequenz, die in vivo in einem Tier exprimiert werden kann und dabei die Funktion eines endogenen Gens, das in dem Tier fehlt oder fehlerhaft ist, bereitstellt oder steigert.

#### X. Verabreichung der Substanzen

**[0208]** Verfahren zur Bestimmung der Dosierungen von Verbindungen, die an einen Patienten verabreicht werden sollen, und die Arten der Verabreichung der Verbindungen an einen Organismus sind in der US-Anmeldung Seriennr. 08/702,282, eingereicht am 23. August 1996, und der Internationalen Patentanmeldung WO 96/22976, veröffentlicht 01. August 1996, offenbart. Der Durchschnittsfachmann wird anerkennen, dass diese Beschreibungen für die vorliegende Erfindung anwendbar sind und leicht daran angepasst werden können.

**[0209]** Die genaue Dosierung hängt von verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Art der zu behandelnden Erkrankung, der bestimmten zu verwendenden Zusammensetzung und die Größe und der physiologische Zustand des Patienten, ab. Therapeutisch wirksame Dosen für die hier beschriebenen Verbindungen können anfänglich aus Zellkultur und Tiermodellen abgeschätzt werden. Zum Beispiel kann eine Dosis in Tiermodellen formuliert werden, um einen zirkulierenden Konzentrationsbereich zu erreichen, der anfänglich den  $IC_{50}$ , wie in Zellkulturassays bestimmt, berücksichtigt. Die Daten des Tiermodells können verwendet werden, um die verwendbaren Dosen beim Menschen genauer zu bestimmen.

**[0210]** Die Plasmahalbwertszeit und die Bioverteilung des Arzneimittels und der Metabolite in dem Plasma, den Tumoren und den Hauptorganen können ebenfalls bestimmt werden, um die Auswahl der Arzneimittel, die zur Inhibition einer Erkrankung am besten geeignet sind, zu erleichtern. Diese Messungen können durchgeführt werden. Zum Beispiel kann eine HPLC-Analyse auf dem Plasma eines Tieres, das mit dem Arzneimittel behandelt worden ist, durchgeführt werden und der Ort der radiomarkierten Verbindungen kann unter Verwendung von Detektionsverfahren, wie z.B. Röntgenstrahlen, CAT-Scan und MRI, bestimmt werden. Verbindungen, die eine wirksame inhibitorische Aktivität bei den Screening-Assays zeigen, aber schlechte pharmakokinetische Charakteristika haben, können durch Verändern der chemischen Struktur und erneutes Testen optimiert werden. In diesem Zusammenhang können Verbindungen, die gute pharmakokinetische Charakteristika zeigen, als ein Modell verwendet werden.

**[0211]** Toxizitätsstudien können ebenfalls durchgeführt werden durch Messen der Blutzellzusammensetzung. Zum Beispiel können Toxizitätsstudien in einem geeigneten Tiermodell wie folgt durchgeführt werden: 1) die Verbindung wird an Mäuse (eine unbehandelte Kontrollmaus sollte ebenfalls verwendet werden) verabreicht; 2) Blutproben werden periodisch aus der Schwanzvene aus einer Maus in jeder Behandlungsgruppe erhalten und 3) die Proben werden bezüglich roter und weißer Blutzellzahlen, der Blutzellzusammensetzung und des Prozentsatzes an Lymphozyten gegenüber polymorphonukleären Zellen analysiert. Ein Vergleich der Ergebnisse für jede Dosierungskur mit den Kontrollen zeigt an, ob Toxizität vorliegt.

**[0212]** Am Ende jeder Toxizitätsstudie können weitere Studien durch Opfern der Tiere (bevorzugt in Übereinstimmung mit dem American Veterinary Medical Association Guidelines Report of the American Veterinary Medical Assoc. Panel on Euthanasia, Journal of American Veterinary Medical Assoc., 202:229-249, 1993) durchgeführt werden. Repräsentative Tiere aus jeder Behandlungsgruppe können dann durch grobe Leichenschau für sofortigen Beweis von Metastasen, ungewöhnlicher Krankheit oder Toxizität untersucht werden. Grobe Abnormitäten im Gewebe werden notiert und die Gewebe werden histologisch untersucht. Verbindungen, die eine Reduktion des Körpergewichts oder der Blutkomponenten verursachen, sind weniger bevorzugt, als Verbindungen mit Nebeneffekten auf Hauptorgane. Im Allgemeinen ist die Verbindung weniger bevorzugt, je größer die Nebenwirkung ist.

**[0213]** Für die Behandlung von Krebs liegt die erwartete tägliche Dosis an hydrophoben pharmazeutischen Agenzien zwischen 1 bis 500 mg/Tag, bevorzugt 1 bis 250 mg/Tag und am bevorzugtesten 1 bis 50 mg/Tag. Arzneimittel können weniger häufig abgegeben werden, vorausgesetzt die Plasmaniveaus der aktiven Einheit sind ausreichend, um die therapeutische Wirksamkeit aufrecht zu erhalten.

**[0214]** Die Plasmaniveaus sollten die Potenz des Arzneimittels widerspiegeln. Im Allgemeinen sind die Plasmaniveaus, die notwendig ist, um Effizienz zu erreichen, niedriger, je potenter die Verbindung ist.

## Beispiele

**[0215]** Die unten aufgeführten Beispiele sind nicht begrenzend und sind nur repräsentativ für verschiedene Aspekte und Merkmale der vorliegenden Erfindung. Die Beispiele unten zeigen die Isolierung und Charakterisierung von STE20-verwandten Kinase der Erfindung.

Beispiel 1: Isolierung von cDNAs, die für Säugetier STE20-verwandte Proteinkinasen kodieren

## Materialien und Verfahren

## Identifikation neuer Klone

**[0216]** Gesamt-RNAs wurden unter Verwendung des Guanidin-Salze/Phenol-Extraktionsprotokolls von Chomczynski und Sacchi (P. Chomczynski und N. Sacchi, Anal. Biochem. 162, 156 (1987)) aus primären menschlichen Tumoren, normalen und Tumorzelllinien, normalem menschlichen Gewebe und aus sortierten menschlichen hematopoetischen Zellen isoliert. Diese RNAs wurden verwendet, um einsträngige cDNA unter Verwendung des Superscript Preamplification Systems (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD; Gerard, GF et al. (1989), FOCUS 11, 66) unter Bedingungen, die von dem Hersteller vorgeschlagen werden, zu erzeugen. Eine typische Reaktion verwendete 10 µg Gesamt-RNA mit 1.5 µg Oligo(dT)<sub>12-18</sub> in einem Reaktionsvolumen von 60 µl. Das Produkt wurde mit RNaseH behandelt und auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Für die folgende PCR-Amplifikation wurden 1-4 µl dieses sscDNA bei jeder Reaktion verwendet.

**[0217]** Degenerierte Oligonukleotide wurden an einem Applied Biosystems 3948 DNA Synthesizer unter Verwendung etablierter Phosphoramiditchemie synthetisiert, mit Ethanol ausgefällt und ungereinigt für PCR verwendet. Die Sequenz von einigen der degenerierten oligonukleotiden Primer und des Aminosäuremotivs, für das sie kodieren, ist wie folgt:

TRK1 5'-CTGAATTCGGNGCNTTYGGNAARGT-3' GAFGKV (sense)  
 TRK4 5'-GCTGGATCCYTCNGGNNGCATCCA-3' WMPPE (antisense)  
 ROS1 5'-GCNTTYGGNGARGTNTAYGARGG-3' AFGEVYEG (sense)  
 CCK4b 5'-GCTGGATCCYTCNGGNSWCATCCA-3' WMSPE (antisense)  
 CCK4c 5'-GAGTTYGGNGARGTNTYYTNNG-3' EFGEVYEG (sense)

**[0218]** Diese Primer werden von den Sense- und Antisense-Strängen konservierter Motive innerhalb der katalytischen Domain verschiedener Proteinkinasen abgeleitet. Degenerierte Nukleotidrestbezeichnungen sind N = A, C, G, oder T; R = A oder G; Y = C oder T; H = A, C oder T nicht G; D = A, G oder T nicht C; S = C oder G und W = A oder T.

**[0219]** PCR-Reaktionen werden unter Verwendung von degenerierten Primern, die an multiple einsträngige cDNAs angebracht sind, durchgeführt. Die Primer werden mit einer Endkonzentration von jeweils 5 µM zu einer Mischung, die 10 mM TrisHCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, jeweils 200 µM Deoxynukleosidtriphosphat, 0.001% Gelatine, 1.5 U AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer/Cetus) und 1-4 µl cDNA enthält, hinzugegeben. Im Anschluss an 3 min Denaturation bei 95°C waren die Zyklisierungsbedingungen 94°C für 30 s, 50°C für 1 min und 72°C für 1 min 45 s für 35 Zyklen. PCR-Fragmente, die zwischen 300-350 bp migrieren, wurden aus 2% Agarosegels unter Verwendung des GeneClean Kit (Bio101) isoliert und T-A geklont in den pCRII-Vektor (Invitrogen Corp. U.S.A.), gemäß des Protokolls des Herstellers.

**[0220]** Die Kolonien wurden für Miniplasmid DNA-Zubereitungen unter Verwendung von Quiagen-Kolonnen ausgewählt und die Plasmid-DNA wurde unter Verwendung eines Zyklus-Sequenz-Farbstoffterminatorkits mit AmpliTaq DNA-Polymerase, FS (ABI, Foster City, CA) entschlüsselt. Sequenzreaktionsprodukte wurden an einem ABI Prism 377 DNA Sequenzer durchgeführt und unter Verwendung des BLAST Alignment-Algorithmus analysiert (Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-10).

**[0221]** Zusätzliche PCR-Strategien wurden verwendet, um verschiedene PCR-Fragmente oder ESTs, die exakte oder nahezu exakte Oligonukleotidprimer, wie in der Ergebnissektion für jede cDNA detailliert beschrieben, zu verbinden. Die PCR-Bedingungen waren wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, das abkühlende Temperaturen für jedes Oligopaar, unter Verwendung der Formel: Tm = 4(G + C) + 2(A + T), berechnet.

## Isolierung von cDNA-Klonen:

**[0222]** Menschliche cDNA-Bibliotheken wurden mit PCR oder EST-Fragmenten, die STE20-verwandten Ge-

nen entsprechen, untersucht. Die Sonden waren durch zufälliges Priming  $^{32}\text{P}$ -markiert und wurden mit  $2 \times 10^6$  cpm/ml im Anschluß an Standardtechniken für Bibliotheks-Screening verwendet. Prehybridisierung (3 h) und Hybridisierung (über Nacht) wurden bei 42°C in 5 X SSC, 5X Denhart's Lösung, 2.5% Dextranulfat, 50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NAHPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 50 % Formamid mit 100 mg/ml denaturierte Lachssperma-DNA durchgeführt. Strikte Waschungen wurden bei 65°C in 0.1X SSC und 0.1% SDS durchgeführt. Das DNA-Sequentialisieren wurde an beiden Strängen unter Verwendung eines Zyklus-Sequenz-Farbstoff-Terminator-Kits mit AmpliTaq DNA-Polymerase, FS (ABI, Foster City, CA) durchgeführt. Die Sequenzreaktionsprodukte wurden an einem ABI Prism 377 DNA-Sequenzer durchgeführt.

#### Makegene Bioinformatics EST Assembler

**[0223]** Die EST-Berichte wurden von ncbi ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) heruntergeladen. Nach Entkomprimieren der Files wurde das Programm 'report2est' ausgeführt, um die folgende Information zu extrahieren: 1) EST Namen, 2) GenBank Zugangsnummern, 3) GenBank Gi-Nummern, 4) Klon Id-Nummern, 5) die Nukleotidsequenzen der ESTs, 6) der Organismus, 7) der Bibliotheksname, 8) der Name des Labors und 9) der Institution. Der Output von 'report2est' ist ein File im FASTA-Format mit all den oben aufgelisteten Informationen in erster Linie von jedem Eintrag, mit Ausnahme der Sequenz, die in der zweiten Linie jedes Eintrags aufgelistet ist. Das resultierende File wird für BLAST formatiert unter Verwendung von 'pressdb' (erhältlich als Teil des ncbi Werkzeug-Kits).

**[0224]** Um ein Gen oder ein Teil eines Gens aus ESTs zu bilden, wurde das Programm 'makegene' entwickelt. Input zu diesem Programm ist eine Abfragesequenz und der/die Organismus/Spezies für welchen ein Gen gebildet werden soll. Eine Anfangssuche nach der formatierten EST-Datenbank, wie oben beschrieben, wird unter Verwendung von BLAST (blastn) durchgeführt. Irgendein Ergebnis, das Warnungen enthält, wie z.B. polyA-Schwänze oder andere Wiederholungselemente werden aus den zukünftigen Anfragen eliminiert. Das Programm 'blast\_parse\_reports' wurde entwickelt, um die FASTA Header Line aus den Suchergebnissen zu extrahieren und der Output wird dann gefiltert, um nur die FASTA Header Lines für die gewünschten Spezies zu extrahieren.

**[0225]** Die Anfangsergebnisse, die bezüglich Warnungen und Spezies gefiltert worden sind, gehen in eine Schleife, bei der Suchen gegenüber der Datenbank wiederholt werden, bis keine neuen ESTs gefunden werden. Die Schleife besteht aus den folgenden Schritten: 1) wenn möglich werden die Namen von beiden Enden des ESTs aus der Datenbank durch Suchen unter Verwendung des 'Clone Id'-Feldes oder des Teils des 'EST-Namen'-Feldes, vor dem .r oder .s Postscript, extrahiert, 2) irgendwelche ESTs, die als Anfrage in vorhergehenden Schleifen verwendet worden ist, wird aus der gegenwärtigen Anfrage durch das Programm 'subtract' entfernt, 3) die resultierende Liste von ESTs wird verwendet, um die Sequenzen aus der Datenbank durch das Programm batch\_parse\_fasta zu extrahieren, 4) BLAST wird erneut gegenüber der Datenbank unter Verwendung jeder Sequenz ausgeführt, 5) die Outputfiles von BLAST, die Warnungen enthalten, werden entfernt, 6) die Ergebnisse werden nach Spezien gefiltert und 7) die Schleife wird wieder betreten, wenn neue ESTs in dem vorhergehenden Lauf durch die Schleife gefunden wurden.

**[0226]** Die ESTs, die von 'makegene' ausgewählt wurden, werden als Input für das Programm 'mpd2\_cluster' (Hide, W., Burke, J. und Davison, D. U. aus Houston, unveröffentlicht) verwendet, wobei die Cluster die Sequenzen überlappen. Die Programme 'contig' (Kerlavage, T., TIGR, unveröffentlicht), 'gde2mult' und 'gde2sing' (Smith, S.W., et al., CABIOS 10, 671-675 (1994)) werden verwendet, um die Ausrichtung und die Konsens-Sequenz der überlappenden ESTs herzustellen.

#### ERGEBNISSE

##### cDNA-Klonen und Charakterisierung von STLK2

**[0227]** Die menschliche STLK2 cDNA-Sequenz ist aus zwei überlappenden EST-Fragmenten, AA191319 und W16504, zusammengesetzt, die unter Verwendung einer Smith-Waterman-Suche der EST-Datenbank mit STLK1 (MST3 GB:AF024636) als eine Anfrage identifiziert werden. Die vollständige Sequenz beider Klonen wurde bestimmt und verwendet, um die menschliche STL2-Sequenz ganzer Länge zu generieren.

**[0228]** Der EST-Klon AA191319 enthält einen 1327 bp-Einsatz und einen ORF von 1146 bp (382 Aminosäuren). Der FST-Klon W16504 enthält einen 2474 bp Einsatz (nicht einschließlich des Poly-A-Schwanzes) und einen ORF von 687 bp (382 Aminosäuren).

**[0229]** Die menschliche STLK2 cDNA (SEQ ID NO.1) ganzer Länge ist 3268 bp lang. AA191319 überspannt die Positionen 1-1327 und W16504 die Positionen 743-3216. Die Überlappung zwischen diesen beiden Klonen zeigt 100 Sequenzidentität. Die menschliche STLK2 cDNA enthält einen 1248 bp ORF, der von einem 181 bp 5' UTR (1-181) und einem 1784 bp 3' UTR (1433-3216) flankiert ist, der von einer 52 Nukleotid polyadenylierten Region gefolgt wird. Ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) wird bei den Positionen 3193-3198 gefunden. Die Sequenz, die das erste ATG flankiert, bildet zu dem Kozak-Konsens für ein Anfangs-Methionin und man nimmt an, dass es die Translationsstartseite für STLK2 ist. Des Weiteren bewahren menschliches STLK2 und die verwandten SOK-1 und MST3-Proteine die Aminosäuresequenz unmittelbar im Anschluss an dieses vermutete Anfangsmethionin.

**[0230]** Verschiedene EST-Fragmente überspannen die vollständige STLK2-Sequenz mit AA191319 am 5' Ende und W16504 an dem 3' Ende.

**[0231]** Alle Suchen gegenüber der öffentlichen Nukleinsäuredatenbank (NRN) und Proteindatenbank (NRP) wurden unter Verwendung des Smith-Waterman Gap Alignment Programms durchgeführt (Smith, TF und Waterman, MS (1981) J. Mol. Biol, 147, 195-197.) mit der PAM100 Matrix und einem offenen Zwischenraum bzw. Extensionsstrafen von 14:1.

#### Beispiel 2: Exprimierungsanalyse von Säugetier STE20-verwandten Protein-Kinasen

##### Materialien und Verfahren

##### Quantitative PCR-Analyse

**[0232]** RNA wurde aus einer Vielzahl von normalen menschlichen Geweben und Zelllinien isoliert. Einsträngige cDNA wurde aus 10 µg jeder RNA wie oben beschrieben unter Verwendung des Superscript Preamplification System (GibcoBRL) synthetisiert. Diese einsträngigen Template wurden dann in einer PCR Reaktion mit 25 Zyklen mit Primern, die für jeden Klon spezifisch sind, verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden an 2% Agarosegelen elektrophoresiert, mit Ethidiumbromid gebeizt und in einer UV-Lichtbox photographiert. Die relative Intensität der 5TK-spezifischen Banden wurde für jede Probe bestimmt.

##### DNA-Anordnungen, die auf Exprimierungsanalyse basieren

**[0233]** Plasmid-DNA-Anordnungsblots wurden durch Beladen von 0.5 µg denaturiertem Plasmid für jede STE20-verwandte Kinase auf eine Nylon-Membran hergestellt. Die [ $\alpha^{32}$ P]dCTP markierte einsträngigen DNA-Sonden wurden aus der Gesamt-RNA, die aus verschiedenen menschlichen Immungewebequellen oder Tumorzellen (Thymus, Dendrocyten, Mastzellen, Monozyten, B-Zellen (primäre, Jurkat, RPMI8226, SR), T-Zellen (CD8/CD4+, TH1, TH2, CEM, MOLT4), K562 (Megakaryozyten) isoliert wurden, synthetisiert. Hybridisierung wurde bei 42°C für 16 Stunden in 6X SSC, 0.1% SDS, 1X Denhardt's Lösung, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA mit  $10^6$  cpm/ml einer [ $\alpha^{32}$ P]dCTP markierten einsträngigen Sonde durchgeführt. Die Filter wurden in 0.1X SSC/0.1% SDS bei 65°C gewaschen und für quantitative Analyse auf einem Molekular Dynamics Phosphorimager ausgesetzt.

##### Ergebnisse

##### Verteilung der STE20-verwandten Gentranskripte bei normalen Geweben und Tumorzelllinien.

**[0234]** Exprimierung der gesamten STE20-verwandten Kinasen wurde in einer Platte mit menschlichen Immungeweben/Zellen durch Hybridisierung an einen DNA-Anordnungsblot, der Plasmide, die für jedes dieser Gene kodieren, enthält, durchgeführt. STLK2 wurde weitestgehend bei allen 14 Immunproben exprimiert, wobei STLK4 und PAK4 in einem Untersatz von 6-7 der Proben besonders exprimiert wurden (Tabelle 3). Mehrere andere Kinasen (SULU3, ZC4, KHS2) hatten eine restriktivere Exprimierung, während andere in nur einer einzigen Immunquelle (STLK3, Thymus; ZC1, Dendrozyten; ZC3, Monozyten; PAK5, Mastzellen und MOLT4) exprimiert wurden und mehrere von all den Immunquellen, die untersucht wurden, abwesend waren (GEK2, SULU1, ZC2, STLK5). Diese Exprimierungsmuster waren recht unterschiedlich zwischen den Mitgliedern derselben Unterfamilie (d.h. ZC1, ZC2, ZC3 und ZC4 oder PAK1, PAK2, PAK3, PAK4, PAK5). Diese Analyse schlägt vor, dass einige dieser Kinasen Kandidat-Targets für verschiedene Immunerkrankungen sein können und das einige, die stärker exprimiert wurden, Funktionen vermitteln können, die der Grundbiologie der meisten proliferativen Zellen gegenüber vital sind.

Tabelle 3: STE20-verwandte Kinase-Exprimierung in einem menschlichen Immunpanel

KINASE	Thymus	Dendrozyten	Mastzellen	Monozyten	B-Zellen	CD8+	CD4+	TH1	TH2
GEK2	350	350	350	350	350	350	350	350	350
SULU1	350	350	350	350	350	350	350	350	350
SULU3	350	350	350	350	12149	350	5115	350	350
STLK2	117770	13771	27620	92036	18305	39109	5408	3564	
STLK3	8624	350	350	350	350	350	350	350	350
STLK4	8524	350	350	350	350	8685	5642	350	350
STLK5	xxx	xxx	Xxx	Xxx	350	350	350	xxx	
ZC1	350	3377	350	350	350	350	350	350	350
ZC2	350	350	350	350	350	350	350	350	350
ZC3	350	350	350	20156	350	350	350	350	350
ZC4	Xxx	Xxx	Xxx	Xxx	350	350	350	xxx	
KHS2	8766	2508	350	56575	350	350	350	350	350
PAK4	32658	7684	3729	100948	350	350	350	1604	
PAK5	350	350	4905	350	350	350	350	350	350

KINASE	CEM (T-Zelle)	MOLT4 (T-Zelle)	JURKAT (B-Zelle)	RPMI8226 (B-Zelle)	SR (B-Zelle)	K562 (MO)
GEK2	350	350	350	350	350	350
SULU1	350	350	350	350	350	350
SULU3	350	350	350	350	350	350
STLK2	47236	53262	47605	22560	65936	30390

STLK3	350	350	350	350	350	350
STLK4	3648	350	26772	1570	350	350
STLK5	350	350	350	xxx	350	350
ZC1	350	350	350	350	350	350
ZC2	350	350	350	350	350	350
ZC3	350	350	350	350	350	350
ZC4	1094	7813	14945	xxx	350	6385
KHS2	350	350	350	350	350	350
PAK4	350	10246	350	3229	350	350
PAK5	350	12672	350	350	350	350

Kinase	(kb)
STLK2	3.8
STLK4	5.0
ZC1	6.9/4.7
ZC2	6.0/8.0
ZC4	5
KHS2	4.4
SULU1	4.5
SULU3	10.0
GEK2	5.5
PAK4	4.8
PAK5	3.5

STLK2 wird weitgehend exprimiert. Die höchsten Exprimierungsniveaus wurden in der Plazenta, der Milz und PBL gefunden.

STLK4 wird ebenfalls weithin in normalen Geweben einschließlich Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Eierstock, Dünndarm, Dickdarm und periphere Blutlymphozyten exprimiert. STLK4 wurde ebenfalls Jurkat T-Zellen dedektiert.

ZC2 wird im Gehirn und den Hoden exprimiert.

SULU 3 zeigte ein weites Muster an Exprimierung in dem normalen Gewebspanel von RNAs.

GEK2 wurde in der Milz, dem Thymus und dem Hoden exprimiert.

PAK4 wurde in den normalen Geweben exprimiert: Gehirn, Hoden und Prostata.

PAK5 zeigte schwache Exprimierungsniveaus in den normalen Geweben: Gehirn, Hoden, Blase, Dickdarm, Nebennierenmark, Milz, fötale Leber, Brust, Zerebralkortex, Cerebellum, Thymus, Speicheldrüse, Lunge, Magen, Duodenum, Uterus, Prostata, Skelettmuskel und Plazenta.

#### Beispiel 4: Generierung von spezifischen Immunoreagenzien auf STE20-verwandten Proteinkinasen

##### Materialien und Verfahren

**[0235]** Spezifische Immunoreagenzien wurden in Kaninchen gegenüber KLH- oder MAP-konjugierte synthetischen Peptiden, die den menschlichen STE20-verwandten Kinasen entsprechen, aufgezogen. C-endständige Peptide wurden an KLH mit Glutaraldehyd konjugiert, wobei ein freies C-Ende offengelassen wurde. Interne Peptide wurden mit einem blockierten N-Ende MAP-konjugiert. Zusätzliche Immunoreagenzien können ebenfalls durch Immunisieren von Kaninchen mit dem bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen, die die cytoplasmatischen Domains jedes neuen STK enthalten, hergestellt werden.

**[0236]** Die verschiedenen Immunseren werden zuerst für ihre Reaktivität und Selektivität auf rekombinantes Protein, vor dem Testen für endogene Quellen, getestet.

##### Western Blots

**[0237]** Proteine in SDS PAGE werden zur Immobilon-Membran transferiert. Der Waschpuffer ist PBST (Standard-Phosphat gepufferte Kochsalzlösung pH 7.4 + 0.1% Triton x 100). Block- und Antikörperinkubationspuffer ist PBST +5% Milch. Antikörperverdünnungen variieren von 1:1000 bis 1:2000.

##### Ergebnisse

**[0238]** Drei SULU1 Antiseren (gegen sowohl 539A und 540A) und zwei SULU3 Antiseren (542A) reagierten spezifisch mit den Peptid-Antigenen. Antiserenbindung war mit dem Peptid in Konkurrenz. Experimente mit Extrakt aus Zellen, die mit Epitop-tagged SULU1- und SULU3-Genen transfiziert waren, sind laufend.

**[0239]** Antiseren gegen das PAK4 C-endständige Peptid 554A reagierte mit gereinigtem Gst-PAK4 und dekidierte ein Protein des korrekten Molekulargewichts aus Gewebskulturzellen. Spezifische Immunoneindringungsexperimente sind anhaltend, um die Reaktivität mit natürlichem Protein zu bestimmen.

**[0240]** Ähnliche Immunisierung und Antiseren-Testexperimente sind laufend für jedes der anderen neuen STE20-Kinasen.

STE20 bezogene Proteinkinasepeptidimmunogene und ihre Spezifität bei der Erkennung endogener Proteine durch Western Blots oder Immunoausfällungen.

Protein	Sequenz	Aa Positionen	Conj.	West.	IP
STLK2	EKFQKCSADESP	405-416	KLH	Y	Y
STLK4	SISNSELFPTTDPVGT	252-267	KLH	Y	Y
SULU1	LDFPKEDYR	890-898	KLH	Y	Y
SULU1	HGDPRPEPRPTQ	409-420	KLH	Y	Y
SULU3	PSTNRAGSLKDPEC	2-14	KLH	N	ND
SULU3	DPRTRASDPQSPPQVSRHK	411-429	KLH	ND	ND
PAK4	CLVPLIQLYRKQTSTC	666-680	KLH	ND	Y
PAK5	PLMRQNRTT	390-398	KLH	Y	Y
PAK5	SGDRRRAGPEKRPKSS	148-163	KLH	Y	Y
PAK5	(C) RRKSLVGTTPYWMAPE	471-485	KLH	Y	ND

ND = bis jetzt nicht durchgeführt

STE20 bezogene GST Fusion Proteinkinase-GST-Fusionsproteinimmunogene und ihre Spezifität bei der Erkennung endogener Proteine durch Western Blots oder Immunoausfällungen.

Protein	Domain	Aa Positionen	West.	IP
ZC1	Coiled-coil/pro/B/C	350-867	Y	Y
ZC1	B	615-732	Y	Y
ZC2	Coiled-coil/pro/B	348-762	ND	ND
ZC2	B	658-762	Y	Y
PAK4	Nterm	252-426	ND	ND
PAK4	Kinase/Cterm	350-681	ND	Y
PAK5	A/Nterm	53-330	ND	ND
PAK5	A/Nterm	53-309	ND	ND

ND = bis jetzt nicht durchgeführt

**[0241]** Das 50kD STLK2 Protein wurde stark exprimiert bei verschiedenen hematopoetischen Zelllinien einschließlich Jurkat, pGL10, Ramos, A20, WEHI-231, K562, HEL und frisch isolierte Thymozyten aus C57/BL6 Mäusen. Hohe Niveaus an STLK2 Exprimierungen wurden ebenfalls bei verschiedenen Tumorzelllinien einschließlich Calu6, Colo205, LS180, MDAM231 und A549 dedektiert.

**[0242]** Das 160 kD ZC1 Protein wurde in Jurkat T-Zellen, Colo205, HCT116, RIE-1, 293T, MDAMB231 und SK-MEL28 dedektiert.

**[0243]** Das 170 kD ZC2 Protein wurde in SK-Mel28 und UACC-62 dedektiert.

**[0244]** Erhöhte Niveaus des 64 kD PAK5 Proteins wurden bei Brustkrebszelllinien MDA-231 und MCF-7 und bei der Lungenkrebszelllinie A549 bestätigt.

## Beispiel 5: Rekombinante Exprimierung und biologische Assays für STE20-verwandte Proteinkinasen

## Materialien und Verfahren

## Transiente Exprimierung der STE20-verwandten Kinase bei Säugetierzellen

**[0245]** Die pcDNA Exprimierungsplasmide (10 µg DNA/100 mm Platte), die die STE20-verwandten Kinasekonstrukte enthalten, werden in 293 Zellen mit Lipofectamin (Gibco BRL) eingeführt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen in 0.5 ml Lösungspuffer (20 mM HEPES, pH 7.35, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Aprotinin) geerntet. Die Probenaliquots wurden durch SDS Polyacrylamidgelektrophorese (PAGE) an 6% Acrylamid/0.5% Bis-Acrylamidgelen wieder aufgelöst und elektrophoretisch zu Nitrozellulose transferiert. Nicht-spezifisches Binden wurde durch Vorinkubierungs-Blots in Blotto (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, die 5% w/v nichtfette getrocknete Milch und 0.2% v/v nonidet P-40 (Sigma) enthält) blockiert und rekombinantes Protein wurde unter Verwendung der verschiedenen Antipeptid- oder Anti-GST-fusionsspezifischen Antiseren detektiert.

## In vitro Kinaseassays

**[0246]** Drei Tage nach der Transfektion mit den STE20-verwandten Kinase-Exprimierungskonstrukten wurde eine 10 cm Platte mit 293 Zellen mit PBS gewaschen und auf Eis mit 2 ml PBSTD, das Phosphatinehibitoren (10 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.25, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Deoxycholat, 0.1% SDS, 0.2% Natriumazid, 1 mM Naf, 1 mM EGTA, 4 mM Natriumorthovanadat, 1% Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin) enthält, aufgelöst. Zellablagerungen wurden durch Zentrifugieren (12000 x g, 15 min, 4°C) entfernt und das Lysat wurde durch zwei aufeinanderfolgende Inkubationen mit 50 µL einer 1:1 Aufschlemung eines Proteins A Sepharose für jeweils 1 Stunde vorgereinigt. Ein halber ml des gereinigten Überstandes wurde mit 10 µL Protein A gereinigte Kinase-spezifische Antiseren (erzeugt aus der GST Fusionsprotein oder Antipeptid-Antiseren) plus 50 µL einer 1:1 Aufschlemung einer Protein A-Sepharose für 2 h bei 4°C umgesetzt. Die Kugelchen wurden dann 2 Mal in PBSTD und 2 Mal in HNTG (20 mM HEPES, pH 7.5/150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10% Glycerol) gewaschen.

**[0247]** Die Immuno-gereinigten Kinasen aus Sepharosekugelchen wurden wieder in 20 µL HNTG plus 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub> und 20 µCi [<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) suspendiert. Die Kinasereaktionen wurden für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt und durch Zugabe von HNTG, das mit 50 mM EDTA ergänzt wurde, gestoppt. Die Proben wurden 6 Mal in HNTG gewaschen, 5 Minuten in SDS Probenpuffer gekocht und durch 6% SDS-PAGE gefolgt von Autoradiographie analysiert. Phosphoamino-Säureanalyse wurde durch Standard 2D-Verfahren auf <sup>32</sup>P-markierten Banden, die aus dem SDS-PAGE Gel entfernt wurden, durchgeführt.

**[0248]** Ähnliche Assays wurden auf bakteriell exprimierten GST-Fusionskonstrukten der Kinasen durchgeführt.

ZC1 Assay-Puffer: 20 mM Tris pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 µM <sup>32</sup>PyATP.

Substrate: Myelin-Grundprotein (MBP) mit 0.28 mg/ml und phosphoryliertes ZC1 Peptid RTV-GRRNTFTGTI-PPYWMAPE bei 17 µM (die schräg unterstrichenen Reste zeigen eine Seite der Phosphorylierung).

**[0249]** Bei höheren Konzentrationen von MgCl<sub>2</sub> (3 mM) ist die Aktivität von ZC1 (sowohl der Kinasedomain ganzer Länge und der rekombinanten Kinasedomain) um das 10-fache größer gegenüber exogenem Substrat-MBP. Im Gegensatz dazu sind die Autophosphorylierung und die Phosphorylierung des Aktivierungsschleifen-Peptidsubstrats beide inhibiert. Mn<sup>++</sup> inhibiert die Autophosphorylierung und die Peptidphosphorylierung durch die abgeschnittene Kinasedomainform nicht. Sowohl die MBP-Phosphorylierung, Mn<sup>++</sup>-verwandte Aktivität und die Autophosphorylierung, Mg<sup>++</sup>-verwandte Aktivität sind jedoch mit Mutation des ATP-Bindungsspins in ZC1 (Lys54Ala), das anzeigt, dass beide Aktivitäten zu der ZC1 Kinasedomain zuordbar sind, eliminiert. SULU1 Assay Puffer: Dieser Puffer ist dem für ZC1 identisch, mit Ausnahme von 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Unter diesen Bedingungen werden andere STE20 Familienmitglieder (PAK4, ZC1) für Autophosphorylierung inhibiert und erfordern die Verringerung des [Mn] auf < 0.3 mM für eine effiziente Autophosphorylierungsreaktion.

Substrate: MBP, Phosvitin oder α-Casein mit 0.28 mg/ml.

PAK4, PAK5 Assay Puffer: 20 mM Hepes pH 7.2, 130 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaF, 20 mM B-Glycerol-phosphat, 0.5 mM DTT, 50 µM ATP, 0.5 µCi <sup>32</sup>PyATP.

Substrate: MBP mit 0.28 mg/ml und Peptidsubstrate, die sich von der PAK5 Aktivierungsschleife mit 2.5 µM ableiten.

STLK2 Assay Puffer: Ähnlich zu den oben beschriebenen, mit Ausnahme der Einbeziehung von 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub> und 5 µCi <sup>32</sup>PyATP.

### Ergebnisse

#### [0250]

##### Proteinexprimierung und Kinaseaktivität von neuen STE20-verwandten Proteinkinasen

Protein	beobachtete Größe (kD)	vorhergesagte Größe (kD)	in vitro Kinase-aktivität	endogene Kinase-aktivität
STLK2	50	46	Y	Y
STLK4	55	50	Y	ND
ZC1	160	140	Y	Y
ZC2	170	150	Y	Y
KHS2	ND	101	ND	ND
SULU1	119	105	Y	Y
SULU3	140	115	ND	Y
PAK4	80	75	Y	Y
PAK5	64	64	Y	Y

**[0251]** Der Durchschnittsfachmann wird leicht anerkennen, dass die vorliegende Erfindung sehr leicht angepasst werden kann, um die Gegenstände auszuführen und die Enden und Vorteile, die genannt sind, als auch die, die inhärent sind, zu erhalten. Die molekularen Komplexe und die Verfahren, Prozeduren, Behandlungen, Moleküle, spezifischen Verbindungen, die hier beschrieben sind, sind vorliegend Repräsentanten der bevorzugten Ausführungsformen, die beispielhaft sind, und sind nicht beabsichtigt als Beschränkungen des Umfangs der Erfindung zu dienen. Veränderungen darin und andere Verwendungen werden dem Durchschnittsfachmann begegnen, welche innerhalb des Umfangs der Erfindung umfasst sind und durch den Umfang der Ansprüche definiert sind.

**[0252]** Es wird dem Durchschnittsfachmann leicht verständlich sein, dass variierende Substitutionen und Modifikationen der hier offenbarten Erfindung durchgeführt werden können, ohne sich von dem Umfang und dem Geist der Erfindung zu entfernen.

**[0253]** Alle Patente und Publikationen, die in der Beschreibung genannt sind, sind für das Niveau des Durchschnittsfachmanns, an den sich die Erfindung richtet, hinweisend.

**[0254]** Die Erfindung, die hier illustrativ beschrieben ist, kann geeigneterweise in Abwesenheit irgendeines Elements oder von Elementen, Beschränkung oder Beschränkungen, die nicht spezifisch hier offenbart sind, ausgeführt werden. Somit kann z.B. in jedem Beispiel hier irgendeiner der Begriffe „umfassen“, „besteht im wesentlichen aus“ und „besteht aus“ mit einem der anderen beiden Begriffe ersetzt werden. Die Begriffe und Ausdrücke, die hier verwendet wurden, werden als Begriffe der Beschreibung und nicht der Beschränkung verwendet und es gibt keine Absicht, dass in der Verwendung dieser Begriffe und Ausdrücke irgendwelche Äquivalente der Merkmale, die gezeigten und beschrieben sind, oder Teile davon ausgeschlossen sind, aber es sollte anerkannt sein, dass verschiedene Modifikationen innerhalb des Umfangs der beanspruchten Erfindung möglich sind.

**[0255]** Insbesondere ist die Erfindung beabsichtigt, ebenfalls die Endformulierung, die durch die Kombination der Arzneistoffträger gebildet wird, abzudecken, obwohl einige hier beschriebene Formulierungen durch die Arzneistoffträger, die zu den Formulierungen hinzugegeben wurden, identifiziert worden sind. Im Speziellen beinhaltet die Erfindung Formulierungen, bei denen alle der hinzugefügten Arzneistoffträger sich während der Formulierung einer Reaktion unterziehen und nicht länger in der Endformulierung oder in den modifizierten Formen vorliegen.

**[0256]** Zusätzlich, wo Merkmale oder Aspekte der Erfindung in Hinblick auf Markush Gruppen beschrieben werden, wird der Durchschnittsfachmann erkennen, dass die Erfindung ebenfalls dabei im Hinblick auf irgendein individuelles Mitglied oder eine Untergruppen der Mitglieder der Markush Gruppe beschrieben sind. Zum Beispiel sind, wenn X als aus der Gruppe, die aus Brom, Chlor und Jod besteht, ausgewählt beschrieben wird, Ansprüche für X, dass Brom ist, und Ansprüche für X, dass Brom und Chlor ist, vollständig beschrieben.

**[0257]** Andere Ausführungsformen liegen innerhalb der folgenden Ansprüche.

SEQUENZ-LISTE

<110> SUGEN, INC.

<120> STE20-verwandte Proteinkinasen

<130> 240/300-PCT

<140>. zu übertragen

<141> hiermit

<150> US 60/081,784

<151> 14.04.1998

<160> 2

<170> FastSEQ für Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 3268

<212> DNA

<213> Säugetier-(menschliches)-STLK2

<400> 1

taacagccca	cctcttagcc	ccgggtctacg	cgccgcacagc	ccagtaaccc	cacttttgtg	60
tgtctccca	ggcccccgtac	aaaaagcctg	ggaggccgc	cgaactaacc	ccggaggagg	120
gagccagttc	gaacccaaagg	ccgcacccgc	gcagaagcgg	agcggaggcag	catcgccctc	180
catggccac	tgcctcggtgg	ttgtccaaagt	gcctggatg	cagaataaca	tagctgtatcc	240
agaagaactg	ttcacaaaat	tagagcqcac	tggaaaggc	tcatttgggg	aagttttcaa	300
aggaatttgat	aaacgttaccc	agcaagtcgt	tgctattaaa	atcatagacc	ttgaggaagc	360
cgaagatgaa	atagaagaca	ttcagcaaga	aataactgtc	tttagtcaat	gtgacagctc	420
atatgtatca	aaatactatg	ggtcatattt	aaagggtct	aaattatgg	taataatgg	480
atacctggc	ggtggttcag	cactggatct	tcttcgagct	ggtcatttg	atgagttcca	540
gattgttacc	atgtctaaagg	aaattttaaa	aggtgtggac	tatctgcatt	cagaaaagaa	600
aattcaccga	gacataaaaag	ctgccaatgt	cttgcctca	gaaceaggag	atgttaaact	660
tgctgattt	ggagggtgt	gtcagctgac	agatacacag	attaaaagaa	atacctttgt	720
gggaacttca	ttttggatgg	ttctctgaat	tattcaacag	tcagctttag	actcaaaagc	780
tgacatttgg	tcatggaa	ttactgtat	tgaactagcc	aaggagagc	cacctaactc	840
cgatatgtat	ccaaatggag	ttctgtttct	tattccaaa	aacaaatctc	caactcttgc	900
tggagacttt	actaagtctt	ttaaggagtt	tattgtatct	tgcctgaaca	aagatccatc	960
atttcgtct	acagaaaaag	aacttctgaa	acacaaaattc	attgtaaaaaa	attcaaaagaa	1020
gacttcttat	ctgactgaac	tgtatagatcg	ttttaaagaga	tggaaaggcag	aggacacacag	1080
tgtatgtaa	tctgatcccg	agggtctgt	ttcggaaatct	accaggcaggg	aaaacaatac	1140
tcatctctaa	tggagcttta	ccacgtctacg	aaagaagct	gtcacaaga	agtacagaa	1200
tggggcagag	caagatctt	tgcacaaacc	gagttgttt	tctatgataa	tcacacctgc	1260
atttgcgtaa	cttacaaacagc	aggacgagaa	taacgtacg	aggaatcagg	cgattgtaaaa	1320
actcgagaaa	agtattgt	ttggctgaage	ccctgtccc	ggeatcacag	ataaaaatgg	1380
gaagaaaacta	attgtaaaaat	ttcaaaatgt	ttcagcagac	gaatccccct	aagaaaacttta	1440

<210> 2  
 <211> 416  
 <212> PRT  
 <213> Säugetier- (menschliches) -STLK2

<400> 2

Met Ala His Ser Pro Val Ala Val Gln Val Pro Gly Met Gln Asn Asn  
 1 5 10 15

Ile Ala Asp Pro Glu Glu Leu Phe Thr Lys Leu Glu Arg Ile Gly Lys  
 20 25 30

Gly Ser Phe Gly Glu Val Phe Lys Gly Ile Asp Asn Arg Thr Gln Gln  
 35 40 45

Val Val Ala Ile Lys Ile Ile Asp Leu Glu Glu Ala Glu Asp Glu Ile  
 50 55 60

Glu Asp Ile Gln Gln Glu Ile Thr Val Leu Ser Gln Cys Asp Ser Ser  
 65 70 75 80

Tyr Val Thr Lys Tyr Tyr Gly Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Lys Leu Trp  
 85 90 95

Ile Ile Met Glu Tyr Leu Gly Gly Ser Ala Leu Asp Leu Leu Arg  
 100 105 110

Ala Gly Pro Phe Asp Glu Phe Gln Ile Ala Thr Met Leu Lys Glu Ile  
 115 120 125

Leu Lys Gly Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Lys Ile His Arg Asp  
 130 135 140

Ile Lys Ala Ala Asn Val Leu Leu Ser Glu Gln Gly Asp Val Lys Leu  
 145 150 155 160

Ala Asp Phe Gly Val Ala Gly Gln Leu Thr Asp Thr Gln Ile Lys Arg  
 165 170 175

Asn Thr Phe Val Gly Thr Pro Phe Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Gln  
 180 185 190

Gln Ser Ala Tyr Asp Ser Lys Ala Asp Ile Trp Ser Leu Gly Ile Thr  
 195 200 205

Ala Ile Glu Leu Ala Lys Gly Glu Pro Pro Asn Ser Asp Met His Pro  
 210 215 220

Met Arg Val Leu Phe Leu Ile Pro Pro Lys Asn Asn Pro Pro Thr Leu Val  
 225 230 235 240

Gly Asp Phe Thr Lys Ser Phe Lys Glu Phe Ile Asp Ala Cys Leu Asn  
 245 250 255

Lys Asp Pro Ser Phe Arg Pro Thr Ala Lys Glu Leu Leu Lys His Lys  
 260 265 270

Phe Ile Val Lys Asn Ser Lys Lys Thr Ser Tyr Leu Thr Glu Leu Ile  
 275 280 285

Asp Arg Phe Lys Arg Trp Lys Ala Glu Gly His Ser Asp Asp Glu Ser  
 290 295 300

Asp Ser Glu Gly Ser Asp Ser Glu Ser Thr Ser Arg Glu Asn Asn Thr  
 305 310 315 320

His Pro Glu Trp Ser Phe Thr Thr Val Arg Lys Lys Pro Asp Pro Lys  
 325 330 335

Lys Val Gln Asn Gly Ala Glu Gln Asp Leu Val Gln Thr Leu Ser Cys  
 340 345 350

Leu Ser Met Ile Ile Thr Pro Ala Phe Ala Glu Leu Lys Gln Gln Asp  
 355 360 365

Glu Asn Asn Ala Ser Arg Asn Gln Ala Ile Glu Glu Leu Glu Lys Ser  
 370 375 380

Ile Ala Val Ala Glu Ala Ala Cys Pro Gly Ile Thr Asp Lys Met Val  
 385 390 395 400

Lys Lys Leu Ile Glu Lys Phe Gln Lys Cys Ser Ala Asp Glu Ser Pro  
 405 410 415

#### Patentansprüche

1. Ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes Nukleinsäuremolekül, das für ein STLK2 Kinasepolypeptid kodiert, wobei das Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz umfasst, die:
  - (a) für die vollständige Aminosäuresequenz wie in SEQ ID Nr.5 gezeigt kodiert;
  - (b) das Komplement der gesamten Nukleotidsequenz von (a) ist;
  - (c) für wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert und Kinaseaktivität hat;
  - (d) das Komplement der gesamten Nukleotidsequenz von (c) ist;
  - (e) für ein Polypeptid mit Kinaseaktivität kodiert, das die in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz mit der Ausnahme umfasst, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die durch die Aminosäuresegmente 1-21 oder 275-416 von SEQ ID Nr.5 definiert sind, fehlen;
  - (f) das Komplement der gesamten Nukleotidsequenz von (e) ist.

2. Das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül aus einem Säugetier isoliert, angereichert oder gereinigt ist.

3. Das Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

4. Das Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das weiter einen Vektor oder Promotor umfasst, um die Transkription in einer Wirtszelle zu starten.

5. Eine Nukleinsäuresonde zum Nachweis einer Nukleinsäure, die für ein STLK2 Kinasepolypeptid kodiert, in einer Probe, wobei die Probe spezifisch an ein Nukleinsäuremolekül hybridisiert, das für die vollständige in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert oder für wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert und eine Kinaseaktivität hat.

6. Eine rekombinante Zelle, die ein Nukleinsäuremolekül umfasst, das für ein STLK2 Kinasepolypeptid, das die vollständige in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz hat, kodiert oder für wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuren kodiert und Kinaseaktivität hat.

7. Ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes STLK2 Kinasepolypeptid mit der in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz oder ein Fragment davon, daß wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr.5 umfasst und Kinaseaktivität hat.

8. Ein isoliertes, angereichertes oder gereinigtes STLK2 Kinasepolypeptid mit der in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz, mit der Ausnahme, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die durch die Aminosäuresegmente 1-21 oder 275-416 der SEQ ID Nr.5 definiert sind, fehlen, und mit Kinaseaktivität.

9. Das Kinasepolypeptidmolekül nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, wobei das Polypeptid aus einem Säugetier isoliert, angereichert oder gereinigt ist.

10. Das Kinasepolypeptidmolekül nach Anspruch 9, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

11. Ein Antikörper oder ein Antikörperfragment mit einer spezifischen Bindungsaffinität an ein STLK2 Kinasepolypeptid mit der vollständigen in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz, wobei ein Fragment davon wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr.5 umfasst und Kinaseaktivität hat oder die in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz hat, mit der Ausnahme, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die durch die Aminosäuresegmente 1-21 oder 275-416 der SEQ ID Nr.5 definiert sind, fehlen.

12. Ein Hybridom, das einen Antikörper, der eine spezifische Bindungsaffinität an ein STLK2 Kinasepolypeptid mit der vollständigen in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz hat, erzeugt, wobei ein Fragment davon wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr.5 umfasst und Kinaseaktivität hat oder die in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz hat, mit der Ausnahme, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die durch die Aminosäuresegmente 1-21 oder 275-416 der SEQ ID Nr.5 definiert sind, fehlen.

13. Ein Verfahren zur Identifizierung einer Substanz, die Kinaseaktivität moduliert, das die Schritte umfasst:

(a) In-Kontakt-bringen eines STLK2 Polypeptids mit der vollständigen in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz, wobei ein Fragment davon wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr.5 umfasst und Kinaseaktivität hat oder die in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz hat, mit der Ausnahme, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die durch die Aminosäuresegmente 1-21 oder 275-416 der SEQ ID Nr.5 definiert sind, fehlen, mit einer Testsubstanz;

(b) Messen der Aktivität des Polypeptids; und

(c) Bestimmen, ob die Substanz die Aktivität des Polypeptids moduliert.

14. Ein Verfahren zur Identifizierung einer Substanz, die Kinaseaktivität moduliert, das die Schritte umfasst:

(a) Exprimieren in einer Zelle eines STLK2 Kinasepolypeptids mit der vollständigen in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz, wobei ein Fragment davon wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der SEQ ID Nr.5 umfasst und Kinaseaktivität hat oder die in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz hat, mit der Ausnahme, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die durch die Aminosäuresegmente 1-21 oder 275-416 der SEQ ID Nr.5 definiert sind, fehlen;

(b) Hinzufügen einer Testsubstanz zu der Zelle; und

(c) Überwachen einer Veränderung im Zellphänotyp oder der Wechselwirkung zwischen dem Polypeptid und einem natürlichen Bindungspartner.

15. Ein Verfahren zum Nachweis eines STLK2 Kinasepolypeptids in einer Probe als ein diagnostisches Werkzeug für eine Erkrankung oder Funktionsstörung, wobei das Verfahren umfasst:

(a) In-Kontakt-bringen der Probe mit einer Nukleinsäuresonde, die spezifisch hybridisiert, unter Hybridisierungsbedingungen, die wenigstens so streng sind wie die Hybridisierung in 50% Formamid, 5x SSC, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml mit Ultraschall behandelte Lachssperma-DNA und 5x Denhart-Lösung bei 42°C; waschen über Nacht mit 2x SSC, 0.1% SDS bei 45°C und waschen mit 0.2x SSC, 0.1% SDS bei 45°C, mit einer STLK2 Kinase-nukleinsäure-targetregion, die für die vollständige in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert oder das Komplement der gesamten Nukleotide davon ist, für wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren der in SEQ ID Nr.5 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert und Kinaseaktivität oder das Komplement der gesamten Nukleotide davon hat oder für ein Polypeptid mit Kinaseaktivität kodiert, das die in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz umfasst, mit der Ausnahme, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die durch die Aminosäuresegmente 1-21 oder 275-416 von SEQ ID Nr.5 definiert sind, fehlen oder das Komplement der gesamten Nukleotide davon ist; und

(b) Nachweisen des Vorhandenseins des Sonde:Targetregionhybrids als eine Indikation der Erkrankung.

16. Das Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Erkrankung oder die Funktionsstörung aus der Gruppe, die aus immunbezogenen Erkrankungen und Funktionsstörungen, Organtransplantation, Herzinfarkt, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfall, Niereninsuffizienz, oxidative stressbezogene neurodegenerative Erkrankungen und Krebs besteht, ausgewählt werden.

17. Ein Verfahren zum Nachweis eines STLK2 Kinasepolypeptids in einer Probe als ein diagnostisches Werkzeug für eine Erkrankung oder eine Funktionsstörung, wobei das Verfahren umfasst:

(a) Vergleichen einer Nukleinsäure-targetregion, die für das STLK2 Kinasepolypeptid kodiert, in einer Probe, wobei das Kinasepolypeptid eine in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz hat, wenigstens 40 aufeinanderfolgende Aminosäuren davon und Kinaseaktivität hat oder die in SEQ ID Nr.5 gezeigte Aminosäuresequenz hat, mit der Ausnahme, daß dieser einer oder mehrere der Bereiche, die von den Aminosäuresegmenten 1-21 oder 275-416 von SEQ ID Nr.5 definiert werden, fehlen, mit einer Kontrollnukleinsäure-Targetregion, die für das STLK2 Kinasepolypeptid kodiert; und

(b) Nachweisen der Unterschiede in der Sequenz oder der Menge zwischen der Targetregion und der Kontroll-targetregion als eine Indikation der Erkrankung oder der Funktionsstörung.

18. Das Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Erkrankung oder die Funktionsstörung aus der Gruppe, die aus immunbezogenen Erkrankungen und Funktionsstörungen, Organtransplantation, Herzinfarkt, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfall, Niereninsuffizienz, oxidative stressbezogene neurodegenerative Erkrankungen und Krebs besteht, ausgewählt werden.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

STE20_h	MAHSPVQSGLPGMQNLKADPPEELFTKLERIGKGSFGEV	DPEELFTKLDRIKGCSFGEVYKGDIDNHTIK	43
MSST3_h	MAHSPVQSGLPGMQNLKADPPEELFTKLERIGKGSFGEV	DPEELFTKLDRIKGCSFGEVYKGDIDNHTIK	47
STLK2_h	MAHSPVAVQVPGMQNNIAADPPEELFTKLERIGKGSFGEV	DPEELFTKLDRIKGCSFGEVYKGDIDNHTIK	47
STLK3_h	TAAPAPAAPPAPAPAPAQQAVGWPICRDAYELQEVWIGSGATAVVAQALICKP	DPEELFTKLDRIKGCSFGEVYKGDIDNHTIK	57
STE20_h	EVVAIKI KIDLEEA EDE DIEDIQQEITVLSQCDSPYITR	YEGSYLKSTIKLWIIIMEYLG	100
MSST3_h	KVVAIKI KIDLEEA EDE DIEDIQQEITVLSQCDSPYITR	YEGSYLKSTIKLWIIIMEYLG	104
STLK2_h	QVVAIKI KIDLEEA EDE DIEDIQQEITVLSQCDSSYV	YEGSYLKSTIKLWIIIMEYLG	104
STLK3_h	ERVAIKI K RINLEKCQTSMDELLKEIQQAMSQCSH	YEGSYLKSTIKLWIIIMEYLG	114
STE20_h	GSALDLIKP[G]P-	LEETIYIATIIREITIKGLOVYLNSERKIH	148
MSST3_h	GSALDLLEP[G]P-	TDIKAANVLL	152
STLK2_h	GSALDLI[RAG]P-	TDIKAANVLL	152
STLK3_h	GSMIDLI[KYIVNRGEHKNGV]L	TDIKAANVLL	171
STLK4_h	GSALDLIKP[G]P-	TDIKAANVLL	41
STE20_h	SEQGDKLADFGV-A	GQITDITQIKRNTFVGT	198
MSST3_h	SEHGEVKLADFGV-A	GQITDITQIKRNTFVGT	202
STLK2_h	SEQGDKLADFGV-A	GQITDITQIKRNTFVGT	202
STLK3_h	GEDGSVQIAADFGVSAFLATG	GQITDITQIKRNTFVGT	227
STLK4_h	GEDGSVQIAADFGVSAFLATG	GQITDITQIKRNTFVGT	97

**Fig. 1A**

STE20_h	W S L G I T A I E L A K G E P P N S O L H P H R V L F L I P K N S P P T L E -	246
MST3_h	W S L G I T A I E L A R G E P P H S E L H P M K V L F L I P K N N P P T L E -	250
STL2_h	W S L G I T A I E L A K G E P P N S D W H P M R V L F L I P K N N P P T L V -	250
STL3_h	W S F G I T A I E L A T G A A P Y H K Y P P M K V L M L T L Q N D P P T L E T G V E D K E M M K K Y G K S F R K L	284
STL4_h	W S F G I T A I E L A T G A A P Y H K Y P P M K V L M L T L Q N D P P S L E T G V Q D K E M L K K Y G K S F R K M	154
STE20_h	Y E A C L N K D P R F R P T A K E L L K H K F I T R Y T K K T S F L T E L I D R Y K R -	289
MST3_h	Y E A C L N K E P P S F R P T A K E L L K H K F I L R N A K K T S Y L T E L I D R Y K R -	293
STL2_h	I D A C L N K D P S F R P T A K E L L K H K F I V K N S K K T S Y L T E L I D R F K R -	293
STL3_h	L S L C L Q K D P S K R P T A A E L L K C K F F Q N A K N R E Y L I E K L L T R T P D I A Q R A K K V R R V P G S	341
STL4_h	I S L C L Q K D P E K R P T A A E L L R H K F F Q N K E F L Q E X T L Q R A P T I S E R A K K V R R V P G S	211
STE20_h	- - - - - W K S E G H G E E S S - S E D S D I D G E A E D G E Q G P I W - - - - -	319
MST3_h	- - - - - W K A E Q S H D D S S - S E D S D A E T D G Q A S G G S D S G - - - - -	323
STL2_h	- - - - - W K A E G H S D D E S D S E S T S R E N N T H P E W - - - - -	324
STL3_h	S G H L H K T E D G O M E W S O D E M O E K - S E E G K A A F S Q E K S R R V K E E - - - - -	382
STL4_h	S C R L H K T E D G C W E W S D D E F D E E - S E E G K A A I S Q L R S P R V K E S I S N S E L F P T T D P V G T	267
STE20_h	- - - - - T F P P T I R P S P H S K L H K G T A L H S S Q K P A E P V K	350
MST3_h	- - - - - D W I F I T I R E K D P K N L E N G A L Q P S D L D R N K K D	354
STL2_h	- - - - - S F T T V R K K P D P K K V Q N G A E Q D L V Q T L S - - -	351
STL3_h	- - - - - N P E I A V S A S T I P E Q I Q S L S V H D S Q G P P N A N E	413
STL4_h	LL Q W P E Q I S A H L P Q P A G Q I A T Q P T Q V S L P P T A E P A K T A Q A L S S G S Q E T K I P - - -	320

三  
三

STE20_h	R Q -- P R S Q C I S T L V R P V F G E L K E K H K Q S G G S V G A L E E L E N A F S L A E E S C P G I S D K L W 405
MST3_h	I P K R P F S Q C I S T I S P L F A E L K E K S Q A C G G N L G S I E E L R G A I Y L A E E A C P G I S D T K W 411
STLK2_h	----- C L S M I I T P A F A E L K Q Q D E N N A S R N Q A I E E L E K S I A V A E A A C P G I T D K W 400
STLK3_h	D Y -- R E A S S C A V N L V I R L R N S R K E L N D I R F E F T P G R D T A G G V S Q E L F S A G L V D G H D V 468
STLK4_h	----- I S L V L R I R N S K E L N D I R F E F T P G R D T A E G V S Q E L I S A G L V D G R D L 366
STE20_h	W H L V E R V Q R F S H N R N N H L T S T R 426
MST3_h	A Q L V Q R L Q R Y S L S G G T S S H 431
STLK2_h	K K L I E K F Q K C S A D E S P 416
STLK3_h	V I V A A N L Q K I V D D P K A L K T L T F K L A S G C D G S E I P D E V K L I G F A Q L S V S 516
STLK4_h	V I V A A N L Q K I V E E P Q S N R S V T F K L A S G V E G S D I P D D G K L I G F A Q L S I S 414

Fig. 1C

SEQ ID NO: 5 STLK2 human Nterm=1-21 kin=22-274

Cterm=275-416

MAHSPVAVQVPGMQNNIADPEELFTKLERIGKGSFGEVFKGIDNRTQQVVAIKIIDLEEA  
EDEIEDIQQEITVLSQCDSSYVTKYYGSYLGSKLWIIMEYLGGGSAEDILLRAGPDEFQ  
IATMLKEILKGKDYLHSEKKIHRDIKAANVLLSEQGDVKLADFGVAGQLTDTQIKRNTFV  
GTPFHMAPEVIQQSAYDSKADIWSLGITAIELAKGEPPNSDMHPMRVLFLIPKNNPPTLV  
GDFTKSFKEFIDACLNKOPSFRPTAKELLKHKFIVKNSKKTSYLTELIDRFKRWKAEGHS  
DDESDSEGSDSESTSRENNTHPEWSFTTVRKKPOPKKVQNGAEQDLVQTLSCL5MIITPA  
FAELKQQDENNASRNQAIIELEKSIAVAEEAACPGITDKMVKKLIEKFQKCSADESP

Fig. 2

SEQ ID NO: 1 STL2 HUMAN

TAACAGCCCCACCTCTAGCCCCGGCTACGGCCGCCAGCCAGTAACCCCACTTTGTG  
 TGTCTCTCCAGGCCCCGATGAAAAGCCTGGGAGGGCCGCCGAACCTACCCCCGGAGGGAG  
 GAGCCAGTCCGAACCCAGGCGCCACCGCCGAGAAGCGGAGCGAGGCAGCTCGCCTC  
 CATGGCCCACTCGCCGGTGGCTGTCCAAGTGCCTGGATGCAGAATAACATAGCTGATCC  
 AGAAGAACTGTTACAAAATTAGAGCGCATTGGAAAGGCTCATTGGGGAAAGTTTCAA  
 AGGAATTGATAACCGTACCCAGCAAGTCGTTGCTATTAAAATCATAGACCTTGAGGAAGC  
 CGAAGATGAAATAGAAGACATTAGCAAGAAATACTGTCTTGAGTCATGTGACAGCTC  
 ATATGTAACAAAATACATGGGTCAATTAAAGGGTCTAAATTATGGATAATAATGGA  
 ATACCTGGCGGTGGTCAGCACTGGATCTCTCGAGCTGGTCCATTGATGAGTTCCA  
 GATTGCTACCATGCTAAAGGAATTAAAAGGTCTGGACTATCTGCATTAGAAAAGAA  
 AATTCAACGAGACATAAAAGCTGCAATGTCTGCTCTAGAACAGGAGATGTTAAACT  
 TGCTGATTTGGAGTTGCTGGTCAAGCAGATACACAGATTAAAGAAATACCTTGT  
 GGGAACTCCATTGGATGGCTCTGAAGTTATTCAACAGTCAGCTATGACTCAAAAGC  
 TGACATTGGTCATTGGAAATTACTGCTATTGAACTAGCCAAGGGAGGCCACCTAACTC  
 CGATATGCATCCAATGAGAGTTCTGTTCTTATTCCAAAACAATCCTCCAACCTTGT  
 TGGAGACTTACTAAGTCTTTAAGGAGTTATTGATGCTTGCTGAACAAAGATCCATC  
 ATTTGTCCTACAGCAAAAGAACTTCTGAAACACAAATTCTGAAAAAAATTCAAAGAA  
 GACTTCTTATCTGACTGAACGTAGATCGTTTAAGAGATGGAAGGGAGAACAG  
 TGATGATGAATCTGATTCCGAGGGCTCTGATTGGAATCTACAGCAGGGAAAACAATAC  
 TCATCCTGAATGGAGCTTACCAACCGTACGAAAGAAGCCTGATCCAAGAAAAGTACAGAA  
 TGGGGCAGAGCAAGATCTTGTGCAAACCTGAGTTGTTGTCTATGATAATCACACCTGC  
 ATTTGCTGAACCTAACAGCAGGACGAGAATAACGCTAGCAGGAATCAGGCATTGAAGA  
 ACTCGAGAAAAGTATTGCTGTGGCTGAAGCCGCTGTCCCAGCATCACAGATAAAATGGT  
 GAAGAAAACATTGAAAAATTCTAAAAGTGTTCAGCAGACGAATCCCCCTAAGAAAACCTA  
 TTATTGGCTTCTGTTCATATGGACCCAGAGAGGCCCCACCAAACCTACGTCAAGATTAAC  
 AATGCTTAACCCATGAGCTCCATGTGCCTTGGATCTTGCAACACTGAAGATTGGAA  
 GAAGCTATTAAACTATTGTGATGGCGTTTATCATTATTTGAAAGGATTATTT  
 GTAAGGAATAACTTTAATACTATAGTTCACCTGTATTCTAGTAAATGTTGAGACACCG  
 TTTGCTTTAAGTATCCCTATTCTTAAGTTACGAGGATGAATAACCTTCACTTCAATATT  
 TCTTGTACTCTACAGTCAGAACATACAGGTCTTCAAAGTCATTCTCAATATT  
 AGCTTTGTAATTCAAGCTTCAAAAGCTTTTTAAAAAAACATGCATATT  
 CTAAAAATGACTATTGGTGGGAGGTGAAATAAGTCATACTTCTTAAACAGAAAATT  
 TAAGTAAAGTCTTTAAATGAAACCTGTAAAAGTATTGACTCTTACCAAGTGGTATG  
 ATATTCCAGGCAGCTCAATGATTATCACATTGAGACCCCTGTGTTGAAGCATTACAGG  
 CAATGTACAGCAACAGAGGTACCTCTTGGTGTAGTATTACATTCTTTAGGTAGA  
 AGAGGCAATTTCACCTTACATGGTTAGAAATTAAAGCAAGATCATTACCCAA

Fig. 3A

GGATAGGTGTTGGTAATGTTGAAGGGAGTTAGTCTGGCTTCATGTTTACATCTTCACT  
AAAATCCCATACTATCTGCTTGGATTGGAGAGCCAAAAAATAAGCTGATTGTCATGTG  
ATTAATATCTGATCAACAGGTATGAATAACTAAATCAGCATATTTGCCATGGTA  
ATAAATTGTCCCTATAAACTATTATATATTTTGTCTTCATAATTATCACTAATAAGCA  
TCAGTTGTTGTTTAAAAGGATATTAGTGAACATTTCTAGTTCATATGAAAATAA  
CCATAGTACAGGGATGATTCTGTCACACAAAAGGTTAAATTAGATTGCACAGTTAATT  
CACTTATATTATGGTACTATTATGTGGGTGATGCCTTTCTTTAAGCCCAGTACATA  
TATTATGCCTGCCTAAGTTCTGAACCTGGGGCTGTATTTCACTAGTAGTTGAGAATTATTGAT  
ATTTAGTTTGATAGCTAATGTTAATTGTTGGATCTGCACAGTTGGTTTGCACAA  
AAGTCATTAAAAAAATCTGAGTAATTGTCAAATATTAAAAGAAAGATATTCTCCTGTA  
AGGAATAACAGTTTAGTCAAAGTGGCCATTACATCCTCTTTAATTACATAACAG  
ATACTTGAGAAAGTTGTTGGTGTATGCCAAGAAAATTCTTTATTGGTGCCTAT  
ATTGTAACAATTATTTAATGCATTGTATTTGAAGTAACGGTCAGTTAAATTTC  
CCTGCTGTGTAACGTAAACACAATTACAGTTATAATCATCTGAGTCTGGAGATAA  
TTTGCAACTCATGTTATGGGTTAAATGAATATTGTAAAGTAAAGCAACAAATT  
ATAAATTGATTATTTGAAACTTACAACACAATTGCATCCAAATAAAATTGTATTGCT  
TATTCTTATAGCTATTGTCCTGTAATCTGTTCTAGGTGAAGCATACTCCAGTGT  
AGGGGTTTGAAGATAAATTAAATTACAGTCACAGTCAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 3B