

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-504061

(P2004-504061A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705		4 B O 2 4
C O 7 K 16/28	C O 7 K 16/28		4 B O 6 3
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00		4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 84 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-514157 (P2002-514157)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成13年7月17日 (2001.7.17)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ ト ベシュレンクテル ハフツング
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月24日 (2003.1.24)		Merck Patent Gesell schaft mit beschræ nkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/008210		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ ルムシュタット フランクフルター シュ トラーセ 250
(87) 国際公開番号	W02002/008253		Frankfurter Str. 25 0, D-64293 Darmstadt , Federal Republic o f Germany
(87) 国際公開日	平成14年1月31日 (2002.1.31)		
(31) 優先権主張番号	00116044.9	(74) 代理人	100088328
(32) 優先日	平成12年7月26日 (2000.7.26)		弁理士 金田 暢之
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E p h A 受容体ファミリーの新規メンバー

(57) 【要約】

E p h A 9 のポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびにかかるポリペプチドを組換え技術によって製造するための方法が開示される。また、診断アッセイにおいて、該 E p h A 9 のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを使用する方法も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

(b) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列に対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなるポリペプチド；

(c) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列に対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド； 10

(d) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列、および

(e) (a) ~ (d) に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体からなる群から選択されるポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列を含んでなる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列である、請求項 1 に記載のポリペプチド。 20

【請求項 4】

(a) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 のポリヌクレオチドに対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列に対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド； 30

(d) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列に対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：1 の配列または少なくとも 15 塩基長を有するそのフラグメントを有する、標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、少なくとも 100 塩基長の塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のポリヌクレオチドの RNA 等価体であるポリヌクレオチド；
もしくは前記ポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド配列、
および前記のポリヌクレオチドの変異体またはフラグメントであるか、あるいは前記のポリヌクレオチドに対して、その全長にわたって相補的であるポリヌクレオチド
からなる群から選択されるポリヌクレオチド。 40

【請求項 5】

(a) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 のポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌ 50

クレオチド、および

(d) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる群から選択される、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

該発現ベクターが適合性宿主細胞に存在する際、請求項1に記載記載されるポリペプチドの生産が可能なポリヌクレオチドを含んでなる発現システム。

【請求項7】

請求項1に記載されるのポリペプチドを発現している、請求項6に記載される発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞またはその膜。

10

【請求項8】

請求項1に記載されるポリペプチドを製造するための方法であって、請求項7に記載される宿主細胞を前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で培養して、該培養培地から該ポリペプチドを回収する工程を含んでなる方法。

【請求項9】

免疫グロブリンのFc領域と請求項1のポリペプチドとからなる融合タンパク質。

【請求項10】

請求項1～3のいずれか一項に記載されるポリペプチドに対して免疫特異的な抗体。

【請求項11】

請求項1に記載されるポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

20

(a) 該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞もしくは膜)あるいはその融合タンパク質に対する、候補化合物の結合を、該候補化合物に直接的または間接的に結合している標識によって、定量的または定性的に測定または検出すること；

(b) 標識された競合剤の存在下で、該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞あるいは膜)あるいはその融合タンパク質に対する、候補化合物の結合の競合を測定すること；

(c) 該ポリペプチドの活性化または阻害により発生するシグナルを、該候補化合物がもたらすか否かを、該ポリペプチドを発現している細胞または細胞膜に適合している検出システムを使用して試験すること；

30

(d) 候補化合物を、請求項1のポリペプチドを含有する溶液に混合して、混合物を作製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定し、そして、何らの候補化合物をも含有しないコントロールの混合物に対して、該混合物の活性を比較すること、または

(e) 細胞中における前記ポリペプチドをコードするmRNAまたは前記ポリペプチドの産生に対する候補化合物の作用を、例えば、ELISAアッセイを使用して検出すること

からなる群から選択される方法と、

(f) 生物工学的または化学的な標準的な手法に従って、前記化合物を製造することを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】

40

【0001】

(発明の分野)

本発明は、以降、時に、「EphA受容体ファミリーの新規メンバー(EphA9)」と称する、新たに同定されたポリペプチド、およびかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断ならびに、治療において潜在的に有用なアゴニスト、アンタゴニストとなりえる化合物の同定におけるそれらの使用、ならびに、かかるポリヌクレオチドの製造に関する。

【0002】

(発明の背景)

医薬探索プロセスは、現在、「機能的ゲノミクス」、すなわち、ハイ・スループットな、

50

ゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を取り込むことで、根本的な革新を経験しつつある。治療の標的として、遺伝子および遺伝子産物を同定する手段として、この方法は、急速に、「ポジショナル・クローニング」に基づく従前の方法に取って代わりつつある。表現型、すなわち、生物学的機能または遺伝子的疾患を同定し、その後、その遺伝子地図の位置に基づいて、その原因となる遺伝子の探知がなされる。

【0003】

機能的ゲノミクスは、ハイ・スループットなDNA配列決定技術、および現に利用可能な多くの分子生物学データベースから、潜在的な重要性を有する遺伝子配列を同定するためのバイオ・インフォマティクスの様々なツールに、大きく頼っている。医薬探索の標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/タンパク質を同定し、その特定を行うことが引き続き求められている。

10

【0004】

(発明の概要)

本発明は、EphA9、特に、EphA9ポリペプチドおよびEphA9ポリヌクレオチド、組換え体およびその製造方法に関する。かかるポリペプチド及びポリヌクレオチドは、それらに限定はされないものの、ウォーカー-ワールブルグ(Walker-Warburg)症候群(WWS)、筋-眼-脳疾病(Cormand, B. et al., Am. J. Hum. Genet. 64, 126-35, 1999)、スチュワート-ジャムペル(Schwartz-Jampel)症候群、タイプI(Nicole, S. et al., Hum. Molec. Genet. 4, 1633-1636, 1995)、ガン、神経変性疾患、新脈管形成、新血管形成、転移、神経可塑性疾患、不適切または望ましくない軸索成長または方向性に関連する疾患、虚血、卒中、免疫学的疾患、異常なまたは阻害する創傷治癒、心疾患、動脈硬化、脈管炎、および関節炎を含む、特定の疾患(以降、「本発明の疾患」と称する)を治療する方法に関連して、注目されている。さらなる形態において、本発明は、本発明により提供される材料を使用して、アゴニストおよびアンタゴニスト(例えば、阻害剤)を同定するための方法、ならびにその同定された化合物を用いて、EphA9の不均衡に関連する症状を治療するための方法に関する。さらに他の形態において、本発明は、不適当なEphA9の活性および濃度に付随する疾患を検出するための診断アッセイにも関する。

20

【0005】

(発明の説明)

第1の形態において、本発明はEphA9ポリペプチドに関する。かかるポリペプチドには、

30

(a) 配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチド；

(b) 配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；

40

(c) 配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；

(d) 配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する単離されたポリペプチド；

(e) 配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチド配列；ならびに

(f) 配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列を有するか、または含んでな

50

る単離されたポリペプチド；

(g)(a)～(f)に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体が含まれる。

【0006】

本発明のポリペプチドは、エフリン・タイプA受容体ファミリーのポリペプチドの一員であると考えられる。脊椎動物では、14のEphおよび4のエフリンは、2つの主要な特異的サブクラスを含み、EphA受容体は、GPI固着されたエフリン(ephrafin)A・リガンドに結合し、EphB受容体(およびEphA4)は、エフリンB・リガンドに結合し、それらは、膜貫通型ドメインおよび短い細胞領域を所有する(Gale et al., Neuron 17, 9-19, 1996, Eph Nomenclature committee, Cell 90, 403-404, 1997)。

【0007】

発現の研究において、Eph受容体およびエフリンは全ての胎児および成人の組織とまではいかなくとも、多くにおいて発現していることが示されている(Gale et al., Neuron 17, 9-19, 1996)。このデータは、それらが広範囲にわたる役割を有することを示唆している。いくつかのケースでは、Eph受容体とエフリンの相互作用により、発現の相補的なドメインもしくは勾配を有しており、一方、他のケースでは、それらの発現するドメインは重複する。機能上の研究においては、Eph受容体とエフリンとの間の相互作用が境界または勾配に沿って起こるといふ、相補的な発現の役割において重要な見識を与える。対抗する細胞におけるEph受容体とエフリンとの間のジャクスタクリン相互作用は、脳および体節のパターニングならびに胎児の発達時期における神経細胞の誘導の過程において、当初は関連していた(さらなる参考例として、Mellitzer G. et al., Curr. Opin. Neurobiol. 10, 400-408, 2000およびその参考文献)。さらに、特定のEph受容体およびそのリガンドは血管系の発達において作用し、腫瘍の血管新生において極めて重要な役割を果たすことが見られた。

【0008】

これと共に、発明者等はエフリン受容体ファミリーの新規一員であるEphA9をコードする新規ヒト遺伝子の配列情報と、4つの異なるスプライシング・アイソフォームの同定を開示する。キナーゼ活性において必須であることが知られているアミノ酸が欠乏していることから、この遺伝子は、内在する触媒キナーゼ活性を有しないエフリン受容体をコードする(Hanks, S.K. et al., Science, 241, 42-52, 1988)。さらに、傍細胞膜域における2箇所の保存リン酸化反応では非リン酸化可能アミノ酸によって置換されている(Holland, S.J. et al., EMBO J. 16, 3877-3888, 1997; Hock, B. et al., Oncogene 17, 255-260, 1998)。

【0009】

特定されたスプライシング・アイソフォームは、受容体の細胞域に影響する。1回のスプライシングにより、タンパク質-タンパク質相互作用およびシグナルにおいて必須であることが知られている、受容体の傍細胞膜域での新規ドメインの挿入を導く(上記参照)。さらなる異なったスプライシングにより、細胞キナーゼ・ドメインのATP結合モチーフの中への挿入を導き、さらに、翻訳停止シグナルにより終了するまで、29のアミノ酸の新規伸張を促す。したがって、この挿入は細胞キナーゼ・ドメインのほぼ全体に渡って移転する。

【0010】

これとともに、発明者等は、ヒトEphA9の4つの異なるアイソフォームの配列情報を開示する。

【0011】

該EphA9の生物学的性質を、以降、「EphA9の生物学的活性」、または「EphA9活性」と称する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのEphA

9の生物学的活性を示す。

【0012】

本発明のポリペプチドには、全ての対立遺伝子形およびスプライス変異体を含む、上記ポリペプチドの変異体もまた含まれる。かかるポリペプチドは、挿入、欠失、ならびに保存的または非保存的であってもよい置換、あるいはそれらの任意の組合せによって、基準のポリペプチドから変異している。特に好ましい変異体は、幾つかの、例えば、50～30、30～20、20～10、10～5、5～3、3～2、2～1、または1個のアミノ酸が、任意の組合せで、挿入、置換または欠失されているものである。

【0013】

本発明のポリペプチドの好ましいフラグメントには、配列番号：2のアミノ酸配列に由来する、少なくとも30、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、あるいは配列番号：2のアミノ酸配列から、少なくとも30、50または100の連続したアミノ酸が末端から除去または欠失しているアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、E p h A 9の生物学的活性をもたらす、生物学的に活性なフラグメントであり、類似する活性または改善された活性を有するか、あるいは望ましくない活性の低下したものも含まれる。また、動物、特に、ヒトにおいて抗原性または免疫原性である、それらのフラグメントも好ましい。

【0014】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、対応する完全長型ポリペプチドをペプチド合成によって製造するために用いることができ；従って、これらの変異体は、本発明の完全長型ポリペプチドを製造するための中間体として用いることができる。本発明のポリペプチドは、「成熟型」タンパク質の形態であってもよく、あるいは、前駆体または融合タンパク質などの、より大きなタンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製に役立つ配列、例えば、反復するヒスチジン残基、あるいは組換え生産の間の安定性に利する付加配列が含まれる、付加的なアミノ酸配列を含むことは、しばしば、有益である。

【0015】

本発明のポリペプチドは、何れかの好適な方法、例えば、天然に存在する提供源や、発現システム（下記参照）を含んでなる遺伝子操作された宿主細胞からの単離、または、例えば、自動化されたペプチド合成機を使用した化学合成によって、あるいは、かかる方法の組合せによって、調製することができる。かかるポリペプチドを調製するための手段は、当該分野では十分に理解されている。

【0016】

さらなる形態において、本発明は、E p h A 9ポリヌクレオチドに関する。かかるポリヌクレオチドには、

(a) 配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7の単離されたポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

(f) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(g) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 のポリヌクレオチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；

(j) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；ならびに

上記のポリヌクレオチドのフラグメントおよび変異体である、またはその全長にわたって、上記のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチド

が含まれる。

20

【0017】

本発明のポリヌクレオチドの好ましいフラグメントには、配列番号：1の配列に由来する、少なくとも15、30、50または100の連続した塩基を有する塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド、あるいは配列番号：1の配列から、少なくとも30、50または100個の連続した塩基が末端から削除または欠失している配列を含んでなるポリヌクレオチドが含まれる。

【0018】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体には、スプライス変異体、対立遺伝子変異体、および1つまたは複数の単一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型体が含まれる。

【0019】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のアミノ酸配列を含んでなり、かつ幾つかの、例えば、50~30、30~20、20~10、10~5、5~3、3~2、2~1、または1個のアミノ酸残基が、任意の組合せで置換、欠失または付加されているポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドもまた含まれる。

【0020】

さらなる形態において、本発明は、本発明のDNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。従って、

(a) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含んでなる；

(b) 配列番号：2 および / または配列番号：4 および / または配列番号：6 および / または配列番号：8 のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物である；

(c) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 のDNA配列のRNA転写物を含んでなる；あるいは

(d) 配列番号：1 および / または配列番号：3 および / または配列番号：5 および / または配列番号：7 のDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；

ならびにそれらに対して相補的であるRNAポリヌクレオチド

が提供される。

【0021】

50

配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7のポリヌクレオチド配列は、HUMRPTK(Fox, G. M. et al., Oncogene 10, 897-905, 1995)との相同性を示す。配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7のポリヌクレオチド配列は、配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7の配列をコードするポリペプチドと同一であってもよく、あるいは遺伝子暗号の縮退(縮重性)の結果によって、同じく配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチドをコードする、配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7以外の配列であってもよい。配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチドは、Q15376(Fox, G. M. et al., Oncogene 10, 897-905, 1995)との相同性および/または構造的類似性を有する、エフリン・タイプA受容体ファミリーの他のタンパク質と類縁している。

10

【0022】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、それらの相動的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似する生物学的な機能/性質を有することが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも1つのEphA9活性を有する。

20

【0023】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒトのB細胞、脳、大腸腫瘍、大腸腺ガン、腎臓腫瘍、肺カルチノイド、胎児の肺および精巢の細胞中のmRNAに由来するcDNAライブラリーから標準的なクローニング技術およびスクリーニング技術を使用して取得することができる(例えば、Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y. (1989)参照)。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリーなどの天然の供給源から取得することもでき、あるいは、周知の、市販の手法を使用して合成することもできる。

30

【0024】

本発明のポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドの組換え製造に使用する際には、該ポリヌクレオチドは、成熟型ポリペプチドのコード配列、それ自体、あるいはリーダーまたは分泌配列、プレ-、もしくはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列、あるいは、他の融合ペプチド部分をコードするコード配列などの、他のコード配列と読み枠を合わせた成熟型ポリペプチドのコード配列を含むことができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にする、マーカー配列がコードされていてもよい。本発明のこの形態の幾つかの好ましい実施態様において、該マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)中に提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86: 821~824に記載されている、ヘキサ・ヒスチジン・ペプチド、あるいはHAタグである。該ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳の配列、スプライシングならびにポリアデニレーション・シグナル、リボソーム結合部位、ならびにmRNAを安定化させる配列などの、非コードの5'ならびに3'配列を含んでもよい。

40

【0025】

配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7のポリヌクレオチド配列に対して、同一であるか、または十分な同一性を有す

50

るポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーション・プローブとして、あるいは核酸増幅反応（例えば、PCR）用のプライマーとして、利用することができる。かかるプローブおよびプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする完全長型cDNAおよびゲノム・クローンを単離するために、ならびに、配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7に対して、高い配列類似性、典型的には、少なくとも95%の同一性を有する他の遺伝子（ヒトの供給源に由来するパラログ、ならびにヒト以外の種に由来するオルソログおよびパラログをコードする遺伝子を含む）のcDNAおよびゲノム・クローンを単離するために使用してもよい。好ましいプローブおよびプライマーは、一般に、少なくとも15塩基、好ましくは少なくとも30塩基を含み、そして少なくとも100塩基ではなくとも、少なくとも50塩基を有してもよい。特に好ましいプローブは、30～50塩基を有するであろう。特に好ましいプライマーは、20～25塩基を有するであろう。

10

【0026】

ヒト以外の種に由来するホモログをも含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングする過程；および前記ポリヌクレオチド配列を含有する完全長型cDNAクローンおよびゲノム・クローンを単離する過程を含んでなる工程によって取得してもよい。かかるハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知である。好ましい厳格なハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性させた剪断サケ精子DNAを含んでなる溶液中で、42℃、一晩インキュベーションし、その後、0.1×SSC中で、約65℃にてフィルターを洗浄することが含まれる。従って、本発明にはまた、配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングすることによって取得される、単離されたポリヌクレオチド、好ましくは少なくとも100塩基の塩基配列を有する単離されたポリヌクレオチドも含まれる。

20

30

【0027】

当業者は、多くの場合において、該ポリペプチドをコードする領域は、5'末端に至るまで完全には伸長していない点で、単離されたcDNA配列は不完全であることもあることを理解している。これは、第1鎖のcDNA合成の際に、mRNAテンプレートのDNAコピーを完成させることができない、逆転写酵素、すなわち、本来、低い「プロセシング能」（ポリメリゼーション反応の間、テンプレートに結合した状態を維持する酵素の能力の指標）を有する酵素の結果である。

【0028】

完全長型cDNAを取得する、あるいは短いcDNAを伸長させるために利用でき、かつ当業者に周知の方法がいくつかあり、例えば、cDNA端の迅速な増幅（RACE）方法に基づく方法がある（例えば、Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998~9002, 1988参照）。例えば、Marathon（商標）法（Clontech Laboratories Inc.）で例示される、この技術の最近の改良は、より長いcDNAの探索を著しく簡単としている。Marathon（商標）法では、選択された組織から抽出されたmRNAと、その両端に連結された「アダプター」配列とから、cDNAが調製される。その後、遺伝子特異的なならびにアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを使用して、cDNAの「失われている」5'端を増幅するために、核酸増幅（PCR）を実施する。その後、「ネスティッド（入れこ型）」プライマー、すなわち、増幅産物の内部にアニーリングするように設計されたプライマー（典型的には、アダプター配列においてさらに3'側

40

50

にアニーリングするアダプター特異的なプライマー、および既知の遺伝子配列においてさらに5'側にアニーリングする遺伝子特異的なプライマー)を使用して、PCR反応を繰り返す。そして、この反応の生成物をDNA配列決定によって分析することができ、また、完全な配列を与えるように、既存のcDNAに該生成物を直接結合させる、あるいは、5'プライマーの設計のために新しい配列情報を利用して、別途に完全長のPCRを実施することのいずれかによって、完全長型のcDNAを構築することができる。

【0029】

本発明の組換えポリペプチドは、発現システムを含んでなる遺伝子操作された宿主細胞から、当該分野で周知の製法によって調製することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドの1つまたは複数を含んでなる発現システム、かかる発現システムで遺伝子操作されている宿主細胞、ならびに、組換え技術による本発明のポリペプチドの製造に関する。無細胞翻訳システムもまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して、かかるタンパク質を製造するために使用することができる。

10

【0030】

組換え製造のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドに対する発現システムまたはその一部を取り込むように、遺伝子操作することができる。ポリヌクレオチドは、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrook et al. (前述) などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている方法によって宿主細胞中に導入することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入する好ましい方法には、例えば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレイプ負荷、パリスティック導入または感染が含まれる。

20

【0031】

適当な宿主の代表的な例には、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、大腸菌、ストレプトミセス属ならびに枯草菌細胞などの細菌細胞；酵母細胞やアスペルギルス属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2細胞や *Spodoptera Sf9* 細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293ならびにBowesメラノーマ細胞などの動物細胞；および植物細胞が含まれる。

30

【0032】

非常に多様な発現システムを使用することができ、例えば、染色体、エピソームおよびウイルスに由来するシステム、例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、パキユロウイルス、パポウイルス (SV40など)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスやレトロウイルスなどのウイルスに由来するベクター、ならびに、コスミドやファージミドなどの、プラスミドおよびバクテリオファージの遺伝子エレメントから誘導されたものなどの、それらの組合せに由来するベクターを使用することができる。該発現システムは、発現を生じさせるとともに、調節をする制御領域を含有してもよい。一般に、宿主内において、ポリペプチドを生産するためのポリヌクレオチドを維持、増殖、または発現させることが可能である、システムまたはベクターはいずれも使用することができる。適切なポリヌクレオチド配列は、例えば、Sambrook et al. (前述) 中に示されているものなどの、周知で慣用の手法種々のいずれかによって発現システムに挿入することができる。適当な分泌シグナルを、小胞体の内腔、ペリプラズム腔または細胞外環境への翻訳タンパク質の分泌を可能にするために、所望するポリヌクレオチドに組み込むことができる。これらのシグナルは、該ポリペプチドに対して内因性であってもよく、あるいは異種のシグナルであってもよい。

40

【0033】

スクリーニング・アッセイにおいて使用するために、本発明のポリペプチドを発現させる

50

際には、該ポリペプチドは細胞の表面で産生されることが、一般に好ましい。この場合、スクリーニング・アッセイにおいて使用するに先立ち、細胞を集菌してもよい。該ポリペプチドが培地内に分泌される場合には、該ポリペプチドの回収および精製を行うため、培地を回収することができる。細胞内で産生される場合には、ポリペプチドを回収する前に、細胞を予め溶解しなければならない。

【0034】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティー・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィおよびレクチン・クロマトグラフィを含む、周知の方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、ハイ・パフォーマンス・液体クロマトグラフィが精製のために使用される。該ポリペプチドが、細胞内合成、単離および/または精製の間に変性する際には、周知のタンパク質のリフォールディング方法を、活性な立体配座を再生させるために使用することができる。

10

【0035】

本発明のポリヌクレオチドは、関連する遺伝子における変異の検出を通して、診断試薬として使用することができる。cDNA配列またはゲノム配列において、配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7のポリヌクレオチドによって特定され、また、機能不全に関連している、変異体型遺伝子の検出は、その遺伝子の過少な発現、過剰発現、あるいは変更された空間的または時間的な発現に起因する、疾患または疾患に対する感受性の診断に付加、あるいは、確定させることができる診断ツールを提供する。遺伝子に変異を有する個体は、当該分野で周知な様々な手法によって、DNAレベルで検出することができる。

20

【0036】

診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検試料などから得ることできる。ゲノムDNAを、直接、検出のために使用してもよく、あるいは、分析に先立ち、PCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅技術を使用して、酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAもまた、同様な手順で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズにおける変化によって検出することができる。点変異は、増幅されたDNAを、標識されたEphA9の塩基配列に対して、ハイブリダイゼーションさせることによって同定することができる。完全に一致する配列は、ミスマッチした二重鎖と、RNase消化、あるいは融解温度における差によって、弁別することができる。DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下での、ゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって、あるいは、直接的なDNA配列決定によって検出してもよい(例えば、Myers et al., Science, (1985) 230: 1242参照)。特定の位置における配列の変化もまた、RNaseならびにS1保護などの、ヌクレアーゼ保護アッセイ、あるいは化学的な切断方法によって、明らかにすることもできる(Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 85: 4397~4401参照)。

30

40

【0037】

EphA9のポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチド・プローブのアレイを、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。かかるアレイは、好ましくは、高密度のアレイまたは格子状である。アレイ化技術の方法は、周知であり、一般的な適用性を有しており、また、遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変動性を含む、分子遺伝学における様々な問題を解明するために使用することができる。例えば、M. Chee et al., Science, 274, 610~613 (1996) およびそれに引用されている他の参考文献を参照する。

【0038】

異常に、低下または増大しているポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの検出もまた

50

、本発明の疾患に対する、被験体の感受性を診断または検出するために使用することができる。低下、または増大した発現は、例えば、核酸増幅、例えば、PCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザン・ブロットおよび他のハイブリダイゼーション法などの、当該分野で周知の、ポリヌクレオチドの定量方法のいずれかを使用して、RNAレベルで測定することができる。宿主に由来するサンプルにおける、本発明のポリペプチドなどのタンパク質レベルを決定するために使用することができるアッセイ手法は、当業者には周知である。かかるアッセイ方法には、放射免疫アッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタン・ブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0039】

したがって、別の形態において、本発明は、

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそのフラグメントもしくはそのRNA転写物；

(b) (a)の配列に対して相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは、配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチドまたはそのフラグメント；あるいは

(d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のポリペプチドに対する抗体を含んでなる診断キットに関する。

【0040】

かかるキットの何れにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な成分を構成することができることは理解される。かかるキットは、疾患または疾患に対する感受性、中でも、特に本発明の疾患を診断する際に有用である。

【0041】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体局在化の研究に有益である。該配列は、個々のヒト染色体上の特定位置に対して、特異的に標的化されており、そして、ハイブリダイゼーションすることができる。本発明に従って、関連する配列を染色体にマッピングすることは、それらの配列を遺伝子関連疾患と関連させる上での、重要な最初の過程である。一度、配列を正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上における該配列の物理的な位置を、遺伝地図データと関連させることができる。かかるデータは、例えば、V. M. C. Kusick、ヒトにおけるメンデル遺伝(Johns Hopkins大学 Welch Medical Libraryを通してオンラインで利用可能である)中で、見出される。同じ染色体領域にマッピングされている、遺伝子と疾患と間の関係は、その後、連鎖解析(物理的に隣り合う遺伝子の同時遺伝)を通して、同定される。ゲノム配列(遺伝子フラグメントなど)に関する、正確なヒト染色体上の局在化は、放射ハイブリッド(RH)マッピングを使用して決定することができる(Walter, M., Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J. および Goodfellow, P., (1994)、ゲノム全体の放射ハイブリッド・マップを構築するための方法、Nature Genetics、7、22~28)。多数のRHパネルを、Research Genetics (Huntsville, AL、米国)から、例えば、GeneBridge 4 RHパネル(Hum. Mol. Genet., 1996、Mar; 5(3): 339~46、ヒトゲノムの放射ハイブリッド・マップ。Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillet D., Muselet D., Prud'Homme J.F., Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach, J. および Goodfellow, P.N.)を入手可能である。このパネルを使用して遺伝子の染色体上の位置を決定するためには、RH DNA上の関心のある遺伝子から設計されたプライマーを使用して、93回のPCRが行われる。これらのDNAのそれぞれは、ハムスターのバックグラウンド(ヒト/ハムスターのハイブリッド細胞株)中に維持された、ランダムなヒト・ゲノム・フラグメントを含んでいる

10

20

30

40

50

。このようなPCRは、目的とする遺伝子のPCR産物の存在または非存在を示す、93のスコアをもたらす。これらのスコアは、既知の位置のゲノム配列に由来するPCR産物を使用して作製されたスコアと比較される。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu/>において行われる。本発明の遺伝子はヒト染色体1p34.1-1p34.4にマッピングされている。

【0042】

本発明のポリヌクレオチド配列はまた、組織発現の研究に対する有益なツールである。かかる研究は、それらをコードするmRNAを検出することによって、コードされたポリペプチドの組織内の発現パターンに関する指標を与える、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの決定を可能とする。使用される技術は、当該分野では周知であり、また、cDNAマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(Schene et al., Science, 270, 467~470, 1995およびShalon et al., Genome Res., 6, 639~645, 1996)などの、格子上に配列されたクローンに対する系内・ハイブリダイゼーション技術、ならびにPCRなどの塩基増幅技術を含む。好ましい方法は、Perkin Elmerから入手可能なTAQMAN(商標)法を使用する。これらの研究による結果は、生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を提供する。加えて、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の形態(例えば、潜在的または調節的な変異をコードするポリペプチドにおける変化を有するもの)によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、本発明のポリペプチドの役割、または疾患におけるその不適切な発現の役割に対する有益な見識を提供することができる。かかる不適切な発現は、時間的、空間的または単に量的な性質のものであってもよい。

【0043】

本発明のポリペプチドは、B細胞、脳、大腸腫瘍、大腸腺ガン、腎臓腫瘍、肺カルチノイド、胎児の肺および精巣において発現される。

【0044】

本発明のさらなる形態は、抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、あるいはそれらを発現している細胞は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的である抗体を作製するための免疫原として、使用することができる。「免疫特異的」の用語は、抗体が、先行技術における他の関連するポリペプチドに対するそれらの親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して、実質的により大きな親和性を有することを意味する。

【0045】

本発明のポリペプチドに対して生成される抗体は、慣用的なプロトコルを使用して、該ポリペプチドまたはエピトープ保持したフラグメント、あるいは細胞を、動物、好ましくは、非ヒト動物に、投与することによって取得することができる。モノクローナル抗体の調製には、継代的な細胞株培養物によって産生される抗体を提供する技術のいずれをも、使用することができる。例には、ハイブリドーマ技術(Kohler, G.およびMilstein, C., Nature(1975), 256:495~497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today(1983), 4:73)、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77~96, Alan R. Liss, Inc., 1985)が含まれる。

【0046】

米国特許第4,946,778号に記載されているものなどの、一本鎖抗体を製造するための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を製造する上で応用することができる。また、トランスジェニック・マウス、あるいは、他の哺乳動物を含む他の生物を、ヒト化抗体を発現させるために使用してもよい。

【0047】

上記抗体は、該ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定するために、あるいは

アフィニティー・クロマトグラフィによって該ポリペプチドを精製するために使用してもよい。本発明のポリペプチドに対する抗体は、また、中でも、本発明の疾患を治療するために使用することができる。

【0048】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまた、ワクチンとして使用することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、その疾患が個体において既に慢性化しているか否かに関わらず、前記動物を疾患から保護するために、抗体および/またはT細胞免疫応答（例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む）を生じさせるに適する、本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含んでなる、哺乳動物における免疫学的応答を誘導するための方法に関する。哺乳動物における免疫学的応答はまた、本発明にかかる疾患から前記動物を保護するための抗体を産生するような、かかる免疫学的応答を誘導するために、*in vivo*で、該ポリヌクレオチドの発現を支配し、かつ該ポリペプチドをコードしているベクターによって、本発明のポリペプチドを送達することを含んでなる方法によって誘導してもよい。該ベクターを投与する1つの方法は、粒子またはそれ以外のものの上へのコーティング物として、所望する細胞中へのそれを促進することによる。かかる核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾型核酸またはDNA/RNAハイブリッドを含むことができる。用途によって、ワクチン、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン配合物（組成物）として提供される。該配合物はさらに、適合するキャリアを含むことができる。ポリペプチドは胃において分解されることもあるため、それは、好ましくは非経口的に投与される（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、あるいは皮内注射）。非経口投与に好適な配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、ならびに配合物を接種者の血液と等張性にする溶質を含んでもよい、水性および非水性の無菌注射液；ならびに懸濁剤または増粘剤を含んでもよい、水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。該配合物は、単位用量または多回用量容器、例えば、密封されたアンプルならびにバイアルに入れて提供することができ、また、使用直前に無菌の液体キャリアを添加するだけでよい、凍結乾燥状態で保存することができる。該ワクチン配合物はまた、水中油型システムや当該分野で既知のその他のシステムなどの、配合物の免疫原性を増強するためのアジュバント・システムを含むことができる。投与量は、該ワクチンの比活性に依存し、型どおりの実験によって容易に決定することができる。

10

20

【0049】

本発明のポリペプチドは、1つまたはそれ以上の疾患状態、特に、既に記載した本発明の疾患に関連している、1つまたはそれ以上の生物学的機能を有する。従って、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定することは有用である。従って、さらなる形態において、本発明は、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するために、化合物をスクリーニングする方法を提供する。かかる方法は、上記のような本発明にの疾患に対する治療および予防目的のために使用することができる、アゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は、様々な供給源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリー、化学化合物のコレクション、および天然産物混合物から同定することができる。このように同定される、かかるアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によっては、ポリペプチド自体の、天然または修飾された基質、リガンド、受容体、酵素など；その構造的または機能的な模倣体（Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, 1(2): 5章(1991)参照)あるいは小分子であってもよい。

30

40

【0050】

該スクリーニング方法は、候補化合物に直接的または間接的に連結されている標識を利用して、該ポリペプチド、あるいは該ポリペプチドまたはその融合タンパク質を表出している細胞または膜に対する候補化合物の結合を単に測定することでもよい。代わりに、該スクリーニング方法は、標識された競合剤（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）に対して、候補化合物のポリペプチドに対する競合的な結合の（定性的または定量的に）測定または検出を含んでもよい。さらに、これらのスクリーニング方法では、該ポリペプチ

50

ドを表出している細胞に適する検出システムを使用して、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって誘起されるシグナルをもたらすか否かを調べることでよい。活性化の阻害剤は、一般には既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして、候補化合物の存在による、アゴニストによる活性化に対する作用を観測する。さらに、該スクリーニング方法は、候補化合物を、本発明のポリペプチドを含有する溶液と混合して、混合体を形成させる工程、混合物におけるEphA9活性を測定する工程、および混合物のEphA9を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較する工程を単に含んでなることでもよい。

【0051】

本発明のポリペプチドは、従来の低い容量のスクリーニング方法、そして、また、ハイ・スループットなスクリーニング(HTS)形態においても、使用することができる。かかるHTS形態には、十分に確立された、96-、また、最近では、384-ウエル・マイクロ・タイター・プレートの使用のみでなく、Schullek et al., Anal. Biochem., 246, 20~29 (1997)に記載されている、ナノウエル法などの開発途上の方法もまた含まれる。

10

【0052】

既に記載したような、Fc部分およびEphA9ポリペプチドから作製されるものなどの、融合タンパク質もまた、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための、ハイ・スループットなスクリーニング・アッセイのために使用することができる(D. Bennett et al., J. Mol. Recognition, 8: 52~58 (1995); ならびにK. Johanson et al., J. Biol. Chem., 270 (16): 9459~9471 (1995)参照)。

20

【0053】

スクリーニング技術

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および該ポリペプチドに対する抗体はまた、細胞内におけるmRNAおよびポリペプチドの産生に対する、添加された化合物の影響を検出するためのスクリーニング方法を形成するために使用することができる。例えば、当該分野で公知の標準的な方法によって、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用して、ポリペプチドの分泌または細胞結合している濃度を測定するために、ELISAアッセイを構築することができる。これは、適当に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を阻害または増強することができる薬剤(また、それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる)を発見するために使用することができる。

30

【0054】

本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の標準的な受容体結合手法を通して、存在する場合には、膜結合型または可溶性の受容体を同定するために使用することができる。これらには、それに限定されないものの、ポリペプチドを、放射性同位体(例えば、¹²⁵I)で標識、化学修飾(例えば、ピオチン化され)、あるいは検出または精製に好適なペプチド配列と融合して、そして推定される受容体の供給源(細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液)とインキュベーションする、リガンド結合ならびにクロスリンク・アッセイが含まれる。他の方法には、表面プラズモン共鳴および分光測定法などの、生物物理学的技術が含まれる。これらのスクリーニング方法はまた、存在する場合には、ポリペプチドのその受容体に対する結合と競合する、該ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために使用することができる。かかるアッセイを行うための標準的な方法は、当該分野では十分に理解されている。

40

【0055】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体、あるいは、ある場合には、該ポリペプチド自体のリガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、場合により、例えば、該リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメント;あるいは本発明のポリペプチドに結合するものの、応答を誘発せず、その結果、ポリペプチドの活性が妨げられる、小分子が含まれる。

50

【0056】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術およびEphA9遺伝子の使用を含んでもよい。トランスジェニック動物を構築する手法は、十分に確立されている。例えば、受精した卵母細胞の雌性前核へのマイクロインジェクション、移植前または移植後の胚へのレトロウイルス移入、エレクトロポレーションなどによって、遺伝子操作された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入を通して、EphA9遺伝子を導入することができる。特に有用なトランスジェニック動物は、その動物のゲノム内において、動物の遺伝子がヒトの等価体によって置き換えられている、所謂「ノック・イン」動物である。ノック・イン・トランスジェニック動物は、医薬探索のプロセスにおいて、化合物はヒトの標的に対して特異的であるという、標的の妥当性検証用に有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、内因性DNA配列によってコードされている、本発明のポリペプチドに対する動物オルソログの発現が細胞内で部分的または完全に無効とされている、所謂「ノック・アウト」動物である。遺伝子のノック・アウトは、技術の限界の結果として、特異的な細胞または組織を対象とする、特定の細胞または組織においてのみ起きていてもよく、あるいは、動物内の全て、または実質的に全ての細胞において生じてもよい。トランスジェニック動物の手法はまた、導入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に供するために発現させられる動物全体の発現・クローニング・システムを提供する。

10

【0057】

上記方法において使用されるスクリーニング・キットは、本発明のさらなる形態をなす。かかるスクリーニング・キットは、

20

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；

を含んでなり、好ましくは、前記のポリペプチドは、配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8のものである。

【0058】

かかるキット何れの中においても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な構成要素を構成することは理解される。

【0059】

(用語集)

下記の定義は、本明細書中で既に頻繁に使用されているいくつかの用語の理解を容易にするために提供される。

30

【0060】

本明細書中に用いられる「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、ならびにヒト化抗体、同様に、Fabフラグメントをも包含し、Fabまたは他の免疫グロブリンの発現ライブラリー生成物をも包含する。

【0061】

「単離(された)」は、その天然の状態から、「ヒトの手によって」変化していること、すなわち、自然界に存在する場合、その本来の環境から変化、または移動されているか、あるいは、その両方であることを意味する。例えば、生きた生物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離」されてはいないが、その天然状態の共存物質から分離された、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、この用語の本明細書中の用法に従うと、「単離」されている。さらに、形質転換、遺伝子操作、または何らかの他の組換え方法によって、生物中に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その生物が生存または非生存かのいずれでも、前記生物中に依然として存在している場合でさえ、「単離」されている。

40

【0062】

「ポリヌクレオチド」は、一般には、非改変型または改変型のRNAあるいはDNAであってもよい、任意のポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチ

50

ド (DNA) を指す。「ポリヌクレオチド」には、限定ではないものの、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖、または、より典型的には、二本鎖の、あるいは、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であってもよい、DNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子が含まれる。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、あるいはRNAとDNAとの両方を含んでなる三重鎖領域をもいう。用語「ポリヌクレオチド」はまた、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。「修飾(された)」塩基には、例えば、トリチル化された塩基、ならびに、イノシンなどの非通常型の塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに対して行うことができ、従って、「ポリヌクレオチド」は、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態と同様に、自然界に典型的に見出されるような、ポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態をも包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと称される、比較的短いポリヌクレオチドをも包含する。

10

【0063】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合(すなわち、ペプチド等配電子体)によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含んでなるポリペプチドのいずれをも指す。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと広く呼ばれる短い鎖、ならびに、一般にはタンパク質と呼ばれる、より長い鎖の双方ともをいう。ポリペプチドは、遺伝子によってコードされる20種のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することができる。「ポリペプチド」には、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、あるいは当該分野で周知の化学的な修飾方法のいずれかによって、修飾がなされたアミノ酸配列が含まれる。かかる修飾は、基本的な教本、およびより詳細な専門書、ならびに数多くの研究文献中に、広く記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポリペプチド内のいずれの位置に生じさせることもできる。同じタイプの修飾が、所与ポリペプチド内のいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在してもよいことが理解される。また、所与のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝がなされてもよく、また、分枝を有する、または有していない、環状であってもよい。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、翻訳に続く天然のプロセスに起因しても、あるいは合成的方法によって作製されてもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ピオチン化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、クロス・リンク形成、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPI・アンカー形成、ヒドロキシ化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファー・RNA媒介付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、*Proteins - Structures and Molecular Properties*、第2版、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、New York、1993; World、F.、翻訳後のタンパク質修飾:全体像および展望、1~12、*Post-translational Covalent Modification of Proteins*、B. C. Johnson編、Academic Press、New York、1983; Seiffter et al.、「タンパク質修飾および非タンパク質補助因子の分析」、*Meth. Enzymol.*、182、626~646、1990; Rattan et al.、「タンパク質合成:翻訳後修飾およびエージング」、*Ann. N.Y. Acad. Sci.*、663、48~62、1992参照)。

20

30

40

50

【0064】

ポリペプチド配列の「フラグメント」は、基準の配列よりも短いものの、基準となるポリペプチドと同一の生物学的な機能または活性を本質的に保持しているポリペプチド配列をいう。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

【0065】

「変異体」は、基準となるポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるものの、その本質的な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、基準となるポリヌクレオチドに対して、塩基配列に相違がある。変異体の塩基配列における変異は、基準となるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させても、させなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、下記に説明するように、基準の配列によってコードされるポリペプチド中における、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端の短縮化を引き起こしてもよい。ポリペプチドの典型的な変異体は、基準となるポリペプチドに対して、アミノ酸配列に相違がある。一般に、改変は、基準となるポリペプチドおよび変異体の配列が全体的には非常に類似し、そして多くの領域において同一となるように制限される。変異体ならびに基準となるポリペプチドは、アミノ酸配列において、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組合せによって相違してもよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸残基であっても、なくてもよい。典型的な、保存的置換には、Gly、Ala； Val、Ile、Leu； Asp、Glu； Asn、Gln； Ser、Thr； Lys、Arg； ならびにPheおよびTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子などの天然に存在するものであってもよく、あるいは天然では存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然には存在しない変異体は、変異誘発方法によって、あるいは直接合成によって作製することもできる。また、1つまたは複数の翻訳後の修飾、例えば、グリコシル化、リン酸化、メチル化、ADP-リボシル化などを有するポリペプチドも、また変異体には含まれる。実施態様には、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化、ならびにC末端グリシンの修飾が含まれる。

【0066】

「対立遺伝子」は、ゲノム中の所与の遺伝子座に存在する遺伝子の、2つまたはそれ以上の選択的な形態の1つをいう。

【0067】

「多型」は、集団内における、ゲノムにおける所与の位置における塩基配列（仮に関連する場合には、コードされるポリペプチド配列）の変動をいう。

【0068】

「単一塩基多型」(SNP)は、集団内においてゲノム内の1つの塩基位置における、塩基変動の発生をいう。SNPは、遺伝子内で、あるいはゲノムの遺伝子間領域内で起こってもよい。SNPは、対立遺伝子特異的増幅(ASA)を使用してアッセイすることができる。該プロセスには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーが、アッセイされる多型に対して、逆方向に相補となるように使用される。この共通プライマーは、多型な塩基から50bpから1500bpの間で隔たったものとできる。それ以外の2つ（またはそれ以上）のプライマーは、最後の3'塩基が、多型を構成する2つ（またはそれ以上）の対立遺伝子の1つと一致するように変化している点を除いて、互いに同一である。そして、それぞれ、共通プライマーおよび1つの対立遺伝子特異的プライマーを使用して、2つ（またはそれ以上）のPCR反応を、サンプルDNAについて行う。

【0069】

本明細書中で使用されている「スプライス変異体」は、同じゲノムDNA配列から一旦転写され、ただし、択一的なRNAスプライシングを受けている、RNA分子から作製されたcDNA分子をいう。択一的なRNAスプライシングは、一般には、イントロンを除く

10

20

30

40

50

ために、一次RNA転写物がスプライシングを受ける際に生じ、それぞれ、異なるアミノ酸配列をコードしてもよい、1つ以上のmRNA分子の産生を引き起こす。スプライス変異体の用語はまた、上記のcDNA分子によってコードされるタンパク質をもいう。

【0070】

「同一性」は、その配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の間における相互関係を反映している。一般に、同一性は、対比がなされている配列の長さによって、2つのポリヌクレオチド配列、あるいは2つのポリペプチド配列の、それぞれ塩基毎またはアミノ酸毎の厳密な一致をいう。

【0071】

「%同一性」 - 正確な一致が存在しない配列については、「%同一性」を決定することができる。一般に、対比すべき2つの配列を、配列間で最大の相関を与えるようにアラインメントされる。これには、アラインメントの程度を高めるために、「ギャップ」をいずれか一方の配列または両方の配列に挿入することを含んでもよい。%同一性は、比較されている配列のそれぞれの全長にわたって、決定してもよく（所謂、全体的なアラインメント）、同じ長さまたは非常に類似する長さの配列に対して、特に適している；あるいは、より短い、限定された長さによって、決定してもよく（所謂、局所的なアラインメント）、不ぞろいな長さの配列において、より好適である。

10

【0072】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列の間における関係に対する、より精巧な、さらなる尺度である。一般に、「類似性」は、残基毎に基づき、（同一性に関してと、同様に）比較されている配列それぞれからの、相互に対をなす残基間における正確な一致だけでなく、正確な一致が存在しない場合にも、進化的な基準に基づいて、1つの残基は、他方に対する適当な置換であるかどうかをも考慮する、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸間での比較を意味する。この蓋然性は、付随した「スコア」を有し、2つの配列の「%類似性」は、それに基づき決定することができる。

20

【0073】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法は、当該分野では周知となっている。従って、例えば、ウイスコンシン配列分析パッケージ バージョン 9.1 (D evereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12, 387~395, 1984; Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin, 米国) 中の利用可能なプログラム、例えば、BESTFIT およびGAP プログラムを、2つのポリヌクレオチド間の%同一性、ならびに2つのポリペプチド配列間の%同一性および%類似性を決定するために使用してもよい。BESTFITは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム (J. Mol. Biol., 147, 195~197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482~489, 1981) を使用して、2つの配列間における、類似性の最も良い1つの領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の比較に対してより適しており、該プログラムは、より短い配列は、より長いものの一部を表すことを仮定している。一方、GAPは、NeddlemanおよびWunschのアルゴリズム (J. Mol. Biol., 48, 443~453, 1970) に従って、「最大の類似性」を見出しつつ、2つの配列をアラインメントする。GAPは、ほぼ同じの長さであり、また、アラインメントが長さ全体にわたって期待される配列の比較に対してより適している。好ましくは、比較されるものを、最適にアラインメントするための、各プログラムにおいて使用される「ギャップ加重」および「長さ加重」のパラメータは、それぞれ、ポリヌクレオチド配列に対しては、50および3であり、ポリペプチド配列に対しては、12および4である。好ましくは、比較されている2つの配列を最適にアラインメントした上で、%同一性および類似性を決定する。

30

40

【0074】

50

配列間の同一性および/または類似性を決定するための他のプログラムもまた、当該分野では知られており、例えば、BLASTファミリーのプログラム(Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403~410, 1990; Altschul S. F. et al., Nucleic Acids Res., 25:389~3402, 1997; National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Bethesda, Maryland, 米国)から入手することができ、またwww.ncbi.nlm.nih.govのNCBIのホームページからアクセス可能である)、およびFASTA(Pearson WR, Methods in Enzymology, 183, 63~99, 1990; Pearson W. R. および Lipman D. J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 2444~2448, 1988; ウィスコンシン配列分析パッケージの一部として入手可能である)。

【0075】

好ましくは、BLOSUM62 アミノ酸置換行列(Henikoff S and Henikoff JG, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 10915~10919, 1992)を、比較の前に、ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に予め翻訳する場合をも含み、ポリペプチド配列の比較において使用する。

【0076】

好ましくは、プログラムBESTFITが、基準とするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して、検討するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用され、前記したように、検討と基準とする配列とは、最適にアラインメントされ、また、プログラムのパラメーターは、暫定の値に設定されている。

【0077】

「同一性指標」は、候補配列(ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)と基準の配列とを比較するために使用することができる、配列関連性の尺度である。すなわち、例えば、基準とするポリヌクレオチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指標を有する候補ポリヌクレオチド配列は、該候補ポリヌクレオチド配列は、基準の配列の各100塩基あたり平均して5個までの相違を含んでもよい点を除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つの塩基欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリヌクレオチド配列の5'または3'末端部位に、あるいはこれら末端部位の間の任意な位置で、基準配列内の塩基間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中で点在して、起こってもよい。換言すると、基準となるポリヌクレオチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内の塩基100個毎に、平均して5個までが、任意の組合せで、欠失、置換または挿入されていてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0078】

同様に、ポリペプチドの場合には、基準のポリペプチド配列と比較したときに、例えば、0.95の同一性指標を有する候補ポリペプチド配列は、基準の配列の各100アミノ酸あたり、平均して5個までの違いを該ポリペプチド配列が含んでもよいことを除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、保存的ならびに非保存的な置換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシ末端部位に、あるいはこれら末端部位間の任意の位置に、基準配列内のアミノ酸間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中に点在して、起こってもよい。換言すると、基準のポリペプチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリペプチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内のアミノ酸の100個毎に、平均して5個まで、任意の組合せで、欠失、置換または挿入がなされてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じ

て変更して適用される。

【0079】

塩基またはアミノ酸の相違数と同一性指標との関係は、下記の式で表記でき、 $n_a \times_a - (x_a \cdot I)$

式中、

n_a は、塩基またはアミノ酸の相違数であり、

x_a は、配列番号：1および/または配列番号：3および/または配列番号：5および/または配列番号：7あるいは配列番号：2および/または配列番号：4および/または配列番号：6および/または配列番号：8における塩基またはアミノ酸のそれぞれの総数であり、

I は、同一性指標であり、

\cdot は、乗算演算子に対する記号であり、

その際、 x_a と I との非整数の積は、 x_a から減ずるに先立ち、最も近い整数に切り捨てられる。

【0080】

「ホモログ」は、基準の配列に対して、高度の配列関連性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を示すために、当該分野で使用されている一般的な用語である。かかる関連性は、既に定義されているように、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって、定量化することもできる。この総称的な用語には、「オルソログ」および「パラログ」の用語が含まれる。「オルソログ」は、別の種中における、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価体であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、機能的に類似している、同じ種内にあるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0081】

「融合タンパク質」は、2つの、関連しない、融合された遺伝子またはそのフラグメントによってコードされるタンパク質をいう。その例が、米国特許第5541087号、米国特許第5726044号に開示されている。Fc-EpHA9の場合、融合タンパク質の一部として、免疫グロブリンのFc領域の使用は、治療に使用する際のかかる融合タンパク質の薬物動態学的性質を改善するため、ならびに、二量体型のEpHA9を形成させるために、Fc-EpHA9または該EpHA9の断片の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-EpHA9のDNA構築物は、5'から3'の方向に、分泌カセット、すなわち、哺乳動物細胞からの細胞外への輸送を誘起するシグナル配列、融合パートナーとして、免疫グロブリンのFc領域フラグメントをコードするDNA、およびEpHA9をコードするDNAまたはその断片を含んでなる。ある用途では、融合タンパク質の残部には手を触れることなく、機能的なFc側を変異させ、その固有的な機能的性質(補体結合、Fc受容体結合)を変える、あるいは発現後にFc部分を完全に除くことを可能とすることが望ましい。

【0082】

特許および特許出願に限らず、これらを含む、本明細書中で引用されている刊行物および参考文献の全ては、十分に述べているように、個々の刊行物または参考文献を、参照して組み込むために、明示的かつ個別的に示唆されているように、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。本出願が優先権を主張する特許出願はいずれも、先に刊行物および参考文献に関して記載したと同様に、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。

10

20

30

40

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08253 A2

- (51) International Patent Classification: **C07K 14/00**
- (31) International Application Number: PCT/EP01/08210
- (22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (36) Priority Data: 00116944.9 26 July 2000 (26.07.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except (83)): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE], Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) Inventors: and
(73) Inventors/Applicants (for US only): **HOCK, Björn** [DE/DE], Nordesse 2a, 63477 Maintal (DE); **DÉCKER, Klaus** [DE/DE], Eisenstrasse 5, D 64291 Darmstadt (DE).
- (74) Common Representative: **MERCK PATENT GMBH**, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (81) Designated States (national): *AP, AT, AU, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.*
- (84) Designated States (regional): *ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).*
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/08253 A2

(54) Title: A NOVEL MEMBER OF THE EphA RECEPTOR FAMILY

(57) Abstract: EphA9 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing EphA9 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

A novel member of the EphA receptor family**Field of the Invention**

5 This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides sometimes hereinafter referred to as „novel member of the EphA receptor family (EphA9)“, to their use in diagnosis and in identifying compounds that may be agonists, antagonists that are potentially useful in therapy, and to production of such polypeptides and polynucleotides:

10

Background of the Invention

15 The drug discovery process is currently undergoing a fundamental revolution as it embraces "functional genomics", that is, high throughput genome- or gene-based biology. This approach as a means to identify genes and gene products as therapeutic targets is rapidly superseding earlier approaches based on "positional cloning". A phenotype, that is a biological function or genetic disease, would be identified and this would then be tracked back to the responsible gene, based on its genetic map position.

20 Functional genomics relies heavily on high-throughput DNA sequencing technologies and the various tools of bioinformatics to identify gene sequences of potential interest from the many molecular biology databases now available. There is a continuing need to identify and characterise further genes and their related polypeptides/proteins, as targets for drug discovery.

25

Summary of the Invention

30 The present invention relates to EphA9, in particular EphA9 polypeptides and EphA9 polynucleotides, recombinant materials and methods for their production. Such polypeptides and polynucleotides are of interest in relation to methods of treatment of certain diseases, including, but not

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

2

limited to, Walker-Warburg syndrome (WWS), muscle-eye-brain disease (Cormand, B. et al., Am. J. Hum. Genet. 64, 126-35, 1999), Schwartz-Jampel syndrome, type I (Nicole, S. et al., Hum. Molec. Genet. 4, 1633-1636, 1995), cancer, neurodegenerative disorders, neovasculogenesis, neoangiogenesis, metastasis, neuronal plasticity disorders, disorders associated with improper or undesirable axon outgrowth or orientation, ischemia, stroke, immunological disorders, abnormal or disturbed wound healing, cardiovascular disorders, arteriosclerosis, vasculotitis, arthritis, .., hereinafter referred to as "diseases of the invention". In a further aspect, the invention relates to methods for identifying agonists and antagonists (e.g., inhibitors) using the materials provided by the invention, and treating conditions associated with EphA9 imbalance with the identified compounds. In a still further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate EphA9 activity or levels.

Description of the Invention

In a first aspect, the present invention relates to EphA9 polypeptides. Such polypeptides include:

- (a) a polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;
- (b) a polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;
- (c) a polypeptide comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;
- (d) a polypeptide having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;
- (e) the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8; and

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

3

(f) a polypeptide having or comprising a polypeptide sequence that has an identity index of 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;

5 (g) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (f).

Polypeptides of the present invention are believed to be members of the ephrin type A receptor family family of polypeptides. In vertebrates, the 14 Eph receptors and 8 ephrin ligands comprise two major specificity subclasses: EphA receptors bind to GPI-anchored ephrinA ligands, and EphB receptors (and EphA4) that bind ephrinB ligands, which possess a transmembrane domain and a short cytoplasmic region (Gale et al., Neuron 17, 9-19, 1996, Eph Nomenclature committee, Cell 90, 403-404, 1997).

15 Expression studies have shown, that Eph receptors and ephrins are expressed in many, if not all embryonic and adult tissues (Gale et al., Neuron 17, 9-19, 1996). This data suggests that they have widespread roles. In some cases, interacting Eph receptors and ephrins have complementary domains or gradients of expression, whereas in other cases, their domains of expression overlap. Functional studies have provided important insights into the role of complementary expression in which interactions between Eph receptors and ephrins occur at boundaries or along a gradient. Juxtacrine interactions between Eph receptors and ephrins on opposing cells were initially implicated in 20 patterning of the brain and somites, and in the process of neural cell guidance during embryonic development (for further reading refer to Mellitzer G. et al., Curr. Opin. Neurobiol. 10, 400-408, 2000, and references therein). Also, particular members of the Eph receptors and their ligands have been shown to function in the development of the vascular system and play a pivotal role in tumor angiogenesis (Illan, N. and Madri, J.A., Curr. Opin. Biotech. 10, 536-540, 1999).

30 Herewith we disclose the sequence information of a novel human gene encoding a new member of the Ephrin receptor family, EphA9 and the

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

4

identification of 4 differential splicing isoforms. Due to the absence of amino acids known to be crucial for kinase activity it is very likely that this gene encodes an ephrin receptor with no intrinsic catalytic kinase activity (Hanks, S.K. et al., *Science*, 241, 42-52, 1988). Additionally, the two conserved autophosphorylation sites in the juxtamembrane region are substituted by non-phosphorylatable amino acids (Holland, S.J. et al., *EMBO J.* 16, 3877-3888, 1997; Hock, B. et al., *Oncogene* 17, 255-260, 1998).

The identified splicing isoforms affect the cytoplasmic region of the receptor. One splicing event leads to the insertion of a new domain in the juxtamembrane region of the receptor, a region known to be crucial for protein-protein interaction and signalling (see above). A further differential splicing event leads to an insertion in the middle of the ATP binding motif of the cytoplasmic kinase domain, which adds a novel stretch of 29 amino acids before it ends in a translational stop signal. Thereby, this insertion removes nearly the entire cytoplasmic kinase domain.

Herewith we disclose the sequence information of 4 differential isoforms of human EphA9.

The biological properties of the EphA9 are hereinafter referred to as "biological activity of EphA9" or "EphA9 activity". Preferably, a polypeptide of the present invention exhibits at least one biological activity of EphA9.

Polypeptides of the present invention also includes variants of the aforementioned polypeptides, including all allelic forms and splice variants. Such polypeptides vary from the reference polypeptide by insertions, deletions, and substitutions that may be conservative or non-conservative, or any combination thereof. Particularly preferred variants are those in which several, for instance from 50 to 30, from 30 to 20, from 20 to 10, from 10 to 5, from 5 to 3, from 3 to 2, from 2 to 1 or 1 amino acids are inserted, substituted, or deleted, in any combination.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

5

Preferred fragments of polypeptides of the present invention include a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids truncated or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferred fragments are biologically active fragments that mediate the biological activity of EphA9, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Also preferred are those fragments that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a human.

Fragments of the polypeptides of the invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, these variants may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides of the invention. The polypeptides of the present invention may be in the form of the "mature" protein or may be a part of a larger protein such as a precursor or a fusion protein. It is often advantageous to include an additional amino acid sequence that contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences that aid in purification, for instance multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production.

Polypeptides of the present invention can be prepared in any suitable manner, for instance by isolation from naturally occurring sources, from genetically engineered host cells comprising expression systems (*vide infra*) or by chemical synthesis, using for instance automated peptide synthesizers, or a combination of such methods. Means for preparing such polypeptides are well understood in the art.

In a further aspect, the present invention relates to EphA9 polynucleotides. Such polynucleotides include:

(a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

6

- (b) a polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;
- (c) a polynucleotide having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;
- (d) the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;
- (e) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;
- (f) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;
- (g) a polynucleotide having a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;
- (h) a polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;
- (i) a polynucleotide having or comprising a polynucleotide sequence that has an Identity Index of 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;
- (j) a polynucleotide having or comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence that has an Identity Index of 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, or 0.99 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8; and
- polynucleotides that are fragments and variants of the above mentioned polynucleotides or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

7

Preferred fragments of polynucleotides of the present invention include a polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least 15, 30, 50 or 100 contiguous nucleotides from the sequence of SEQ ID NO: 1, or a polynucleotide comprising a sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous nucleotides truncated or deleted from the sequence of SEQ ID NO: 1.

Preferred variants of polynucleotides of the present invention include splice variants, allelic variants, and polymorphisms, including polynucleotides having one or more single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Polynucleotides of the present invention also include polynucleotides encoding polypeptide variants that comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8 and in which several, for instance from 50 to 30, from 30 to 20, from 20 to 10, from 10 to 5, from 5 to 3, from 3 to 2, from 2 to 1 or 1 amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination.

In a further aspect, the present invention provides polynucleotides that are RNA transcripts of the DNA sequences of the present invention. Accordingly, there is provided an RNA polynucleotide that:

(a) comprises an RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;

(b) is the RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;

(c) comprises an RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7; or

(d) is the RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;

and RNA polynucleotides that are complementary thereto.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

8

The polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7 shows homology with HUMRPTK (Fox, G.M. et al., Oncogene 10, 897-905, 1995). The polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7 is a cDNA sequence that encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8. The polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8 may be identical to the polypeptide encoding sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7 or it may be a sequence other than SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7, which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8. The polypeptide of the SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8 is related to other proteins of the ephrin type A receptor family family, having homology and/or structural similarity with Q15375 (Fox, G.M. et al., Oncogene 10, 897-905, 1995).

Preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention are expected to have, *inter alia*, similar biological functions/properties to their homologous polypeptides and polynucleotides. Furthermore, preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention have at least one EphA9 activity.

Polynucleotides of the present invention may be obtained using standard cloning and screening techniques from a cDNA library derived from mRNA in cells of human B-cells, brain, colon tumor, colon adenocarcinoma, kidney tumor, carcinoid lung, fetal lung, testis, (see for instance, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Polynucleotides of the invention can also be obtained from natural sources such as genomic DNA libraries or can be synthesized using well known and commercially available techniques.

When polynucleotides of the present invention are used for the recombinant production of polypeptides of the present invention, the

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

9

polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide, by itself, or the coding sequence for the mature polypeptide in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro- protein sequence, or other fusion peptide portions. For example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gents *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86:821-824, or is an HA tag. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals, ribosome binding sites and sequences that stabilize mRNA.

Polynucleotides that are identical, or have sufficient identity to a polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7, may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA or as primers for a nucleic acid amplification reaction (for instance, PCR). Such probes and primers may be used to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding polypeptides of the present invention and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding paralogs from human sources and orthologs and paralogs from species other than human) that have a high sequence similarity to SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7, typically at least 95% identity. Preferred probes and primers will generally comprise at least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50, if not at least 100 nucleotides. Particularly preferred probes will have between 30 and 60 nucleotides. Particularly preferred primers will have between 20 and 25 nucleotides.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs from species other than human, may be obtained by a process comprising the steps of screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides; and isolating full-length cDNA and genomic clones containing said polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to the skilled artisan. Preferred stringent hybridization conditions include overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150mM NaCl,

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

10

15mM trisodium citrate), 60 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10 % dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA; followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C. Thus the present invention also includes isolated polynucleotides, preferably with a nucleotide sequence of at least 100, obtained by screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides.

10 The skilled artisan will appreciate that, in many cases, an isolated cDNA sequence will be incomplete, in that the region coding for the polypeptide does not extend all the way through to the 5' terminus. This is a consequence of reverse transcriptase, an enzyme with inherently low "processivity" (a measure of the ability of the enzyme to remain attached to the template during the polymerisation reaction), failing to complete a DNA copy of the mRNA template during first strand cDNA synthesis.

20 There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length cDNAs, or extend short cDNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (see, for example, Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998-9002, 1988). Recent modifications of the technique, exemplified by the Marathon (trade mark) technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the Marathon (trade mark) technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an 'adaptor' sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the "missing" 5' end of the cDNA using a combination of gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using 'nested' primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adaptor specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this reaction can then be analysed by DNA sequencing and a full-length cDNA constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

Recombinant polypeptides of the present invention may be prepared by processes well known in the art from genetically engineered host cells comprising expression systems. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to expression systems comprising a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, to host cells which are genetically engineered with such expression systems and to the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

For recombinant production, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof for polynucleotides of the present invention. Polynucleotides may be introduced into host cells by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) and Sambrook et al. (*ibid*). Preferred methods of introducing polynucleotides into host cells include, for instance, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transfection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as *Streptococci*, *Staphylococci*, *E. coli*, *Streptomyces* and *Bacillus subtilis* cells; fungal cells, such as yeast cells and *Aspergillus* cells; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

A great variety of expression systems can be used, for instance, chromosomal, episomal and virus-derived systems, e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as

cosmids and phagemids. The expression systems may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any system or vector that is able to maintain, propagate or express a polynucleotide to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate polynucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook *et al.*, (*ibid*). Appropriate secretion signals may be incorporated into the desired polypeptide to allow secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, the periplasmic space or the extracellular environment. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals.

If a polypeptide of the present invention is to be expressed for use in screening assays, it is generally preferred that the polypeptide be produced at the surface of the cell. In this event, the cells may be harvested prior to use in the screening assay. If the polypeptide is secreted into the medium, the medium can be recovered in order to recover and purify the polypeptide. If produced intracellularly, the cells must first be lysed before the polypeptide is recovered.

Polypeptides of the present invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxyapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well known techniques for refolding proteins may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during intracellular synthesis, isolation and/or purification.

Polynucleotides of the present invention may be used as diagnostic reagents, through detecting mutations in the associated gene. Detection of a mutated form of the gene characterised by the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7 in the cDNA or genomic sequence and which is associated with a dysfunction will provide a diagnostic tool that can add to, or define, a diagnosis of a disease, or susceptibility to a disease, which results from under-expression, over-expression or altered spatial or temporal expression of the gene.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

13

Individuals carrying mutations in the gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques well known in the art.

5 Nucleic acids for diagnosis may be obtained from a subject's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy or autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or it may be amplified enzymatically by using PCR, preferably RT-PCR, or other amplification techniques prior to analysis. RNA or cDNA may also be used in similar fashion. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by 10 hybridizing amplified DNA to labeled EphA9 nucleotide sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase digestion or by differences in melting temperatures. DNA sequence difference may also be detected by alterations in the electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents, or by direct DNA sequencing (see, for instance, Myers *et al.*, Science (1986) 230:1242). Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S1 protection or the chemical cleavage method (see Cotton *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397-4401).

20 An array of oligonucleotide probes comprising EphA9 polynucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of *e.g.*, genetic mutations. Such arrays are preferably high density arrays or grids. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of 25 questions in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability, see, for example, M.Chee *et al.*, Science, 274, 610-613 (1996) and other references cited therein.

30 Detection of abnormally decreased or increased levels of polypeptide or mRNA expression may also be used for diagnosing or determining susceptibility of a subject to a disease of the invention. Decreased or increased expression can be measured at the RNA level using any of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, nucleic acid amplification, for instance PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization 35 methods. Assay techniques that can be used to determine levels of a protein, such as a polypeptide of the present invention, in a sample derived

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

14.

from a host are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.

Thus in another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit comprising:

(a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or a fragment or an RNA transcript thereof;

(b) a nucleotide sequence complementary to that of (a);

(c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8 or a fragment thereof; or

(d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component. Such a kit will be of use in diagnosing a disease or susceptibility to a disease, particularly diseases of the invention, amongst others.

The polynucleotide sequences of the present invention are valuable for chromosome localisation studies. The sequence is specifically targeted to, and can hybridize with, a particular location on an individual human chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present invention is an important first step in correlating those sequences with gene associated disease. Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. Such data are found in, for example, V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between genes and diseases that have been mapped to the same chromosomal region are then identified through linkage analysis (co-inheritance of physically adjacent genes). Precise human chromosomal localisations for a genomic sequence (gene

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

2.5

fragment etc.) can be determined using Radiation Hybrid (RH) Mapping (Walter, M. Spillelt, D., Thomas, P., Weissenbach, J., and Goodfellow, P., (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, *Nature Genetics* 7, 22-28). A number of RH panels are available from Research Genetics (Huntsville, AL, USA) e.g. the GeneBridge4 RH panel (*Hum Mol Genet* 1996 Mar;5(3):339-46 A radiation hybrid map of the human genome. Gyapay G, Schnitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillelt D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN). To determine the chromosomal location of a gene using this panel, 93 PCRs are performed using primers designed from the gene of interest on RH DNAs. Each of these DNAs contains random human genomic fragments maintained in a hamster background (human / hamster hybrid cell lines). These PCRs result in 93 scores indicating the presence or absence of the PCR product of the gene of interest. These scores are compared with scores created using PCR products from genomic sequences of known location. This comparison is conducted at <http://www.genome.wi.mit.edu/>. The gene of the present invention maps to human chromosome 1p34.1-1p34.4.

29

The polynucleotide sequences of the present invention are also valuable tools for tissue expression studies. Such studies allow the determination of expression patterns of polynucleotides of the present invention which may give an indication as to the expression patterns of the encoded polypeptides in tissues, by detecting the mRNAs that encode them. The techniques used are well known in the art and include in situ hybridisation techniques to clones arrayed on a grid, such as cDNA microarray hybridisation (Schena *et al*, *Science*, 270, 467-470, 1995 and Shalon *et al*, *Genome Res*, 6, 639-645, 1996) and nucleotide amplification techniques such as PCR. A preferred method uses the TAQMAN (Trade mark) technology available from Perkin Elmer. Results from these studies can provide an indication of the normal function of the polypeptide in the organism. In addition, comparative studies of the normal expression pattern of mRNAs with that of mRNAs encoded by an alternative form of the same gene (for example, one having an alteration in polypeptide coding potential or a regulatory mutation) can provide valuable insights into the role of the polypeptides of the present invention, or that of inappropriate

35

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

16

expression thereof in disease. Such inappropriate expression may be of a temporal, spatial or simply quantitative nature.

The polypeptides of the present invention are expressed in B-cells, brain, colon tumor, colon adenocarcinoma, kidney tumor, carcinoid lung, fetal lung, testis.

A further aspect of the present invention relates to antibodies. The polypeptides of the invention or their fragments, or cells expressing them, can be used as immunogens to produce antibodies that are immunospecific for polypeptides of the present invention. The term "immunospecific" means that the antibodies have substantially greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art.

Antibodies generated against polypeptides of the present invention may be obtained by administering the polypeptides or epitope-bearing fragments, or cells to an animal, preferably a non-human animal, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, Immunology Today (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Techniques for the production of single chain antibodies, such as those described in U.S. Patent No. 4,946,778, can also be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms, including other mammals, may be used to express humanized antibodies.

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or to purify the polypeptides by affinity chromatography. Antibodies against polypeptides of the present invention may also be employed to treat diseases of the invention, amongst others.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

17

Polypeptides and polynucleotides of the present invention may also be used as vaccines. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to a method for inducing an immunological response in a mammal that comprises inoculating the mammal with a polypeptide of the present invention, adequate to produce antibody and/or T cell immune response, including, for example, cytokine-producing T cells or cytotoxic T cells, to protect said animal from disease, whether that disease is already established within the individual or not. An immunological response in a mammal may also be induced by a method comprising delivering a polypeptide of the present invention via a vector directing expression of the polynucleotide and coding for the polypeptide *in vivo* in order to induce such an immunological response to produce antibody to protect said animal from diseases of the invention. One way of administering the vector is by accelerating it into the desired cells as a coating on particles or otherwise. Such nucleic acid vector may comprise DNA, RNA, a modified nucleic acid, or a DNA/RNA hybrid. For use as a vaccine, a polypeptide or a nucleic acid vector will be normally provided as a vaccine formulation (composition). The formulation may further comprise a suitable carrier. Since a polypeptide may be broken down in the stomach, it is preferably administered parenterally (for instance, subcutaneous, intramuscular, intravenous, or intradermal injection). Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions that may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water systems and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

35

Polypeptides of the present invention have one or more biological functions that are of relevance in one or more disease states, in particular the

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

18

diseases of the invention hereinbefore mentioned. It is therefore useful to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide. Accordingly, in a further aspect, the present invention provides for a method of screening compounds to identify those that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide. Such methods identify agonists or antagonists that may be employed for therapeutic and prophylactic purposes for such diseases of the invention as hereinbefore mentioned. Compounds may be identified from a variety of sources, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, collections of chemical compounds, and natural product mixtures. Such agonists or antagonists so-identified may be natural or modified substrates, ligands, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide; a structural or functional mimetic thereof (see Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology* 1(2):Chapter 5 (1991)) or a small molecule.

The screening method may simply measure the binding of a candidate compound to the polypeptide, or to cells or membranes bearing the polypeptide, or a fusion protein thereof, by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound. Alternatively, the screening method may involve measuring or detecting (qualitatively or quantitatively) the competitive binding of a candidate compound to the polypeptide against a labeled competitor (e.g. agonist or antagonist). Further, these screening methods may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells bearing the polypeptide. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed. Further, the screening methods may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of the present invention, to form a mixture, measuring a EphA2 activity in the mixture, and comparing the EphA2 activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound.

Polypeptides of the present invention may be employed in conventional low capacity screening methods and also in high-throughput screening (HTS) formats. Such HTS formats include not only the well-established use of 96- and, more recently, 384-well microtiter plates but also emerging

methods such as the nanowell method described by Schullek et al, *Anal Biochem.*, 246, 20-29, (1997).

Fusion proteins, such as those made from Fc portion and EphA9 polypeptide, as hereinbefore described, can also be used for high-throughput screening assays to identify antagonists for the polypeptide of the present invention (see D. Bennett et al., *J Mol Recognition*, 8:52-58 (1995); and K. Johanson et al., *J Biol Chem*, 270(16):9459-9471 (1995)).

10 Screening techniques

The polynucleotides, polypeptides and antibodies to the polypeptide of the present invention may also be used to configure screening methods for detecting the effect of added compounds on the production of mRNA and polypeptide in cells. For example, an ELISA assay may be constructed for measuring secreted or cell associated levels of polypeptide using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art. This can be used to discover agents that may inhibit or enhance the production of polypeptide (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues.

A polypeptide of the present invention may be used to identify membrane bound or soluble receptors, if any, through standard receptor binding techniques known in the art. These include, but are not limited to, ligand binding and crosslinking assays in which the polypeptide is labeled with a radioactive isotope (for instance, ^{125}I), chemically modified (for instance, biotinylated), or fused to a peptide sequence suitable for detection or purification, and incubated with a source of the putative receptor (cells, cell membranes, cell supernatants, tissue extracts, bodily fluids). Other methods include biophysical techniques such as surface plasmon resonance and spectroscopy. These screening methods may also be used to identify agonists and antagonists of the polypeptide that compete with the binding of the polypeptide to its receptors, if any. Standard methods for conducting such assays are well understood in the art.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

20

Examples of antagonists of polypeptides of the present invention include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins that are closely related to the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc.; or a small molecule that bind to the polypeptide of the present invention but do not elicit a response, so that the activity of the polypeptide is prevented.

Screening methods may also involve the use of transgenic technology and EphA9 gene. The art of constructing transgenic animals is well established. For example, the EphA9 gene may be introduced through microinjection into the male pronucleus of fertilized oocytes, retroviral transfer into pre- or post-implantation embryos, or injection of genetically modified, such as by electroporation, embryonic stem cells into host blastocysts. Particularly useful transgenic animals are so-called "knock-in" animals in which an animal gene is replaced by the human equivalent within the genome of that animal. Knock-in transgenic animals are useful in the drug discovery process, for target validation, where the compound is specific for the human target. Other useful transgenic animals are so-called "knock-out" animals in which the expression of the animal ortholog of a polypeptide of the present invention and encoded by an endogenous DNA sequence in a cell is partially or completely annulled. The gene knock-out may be targeted to specific cells or tissues, may occur only in certain cells or tissues as a consequence of the limitations of the technology, or may occur in all, or substantially all, cells in the animal. Transgenic animal technology also offers a whole animal expression-cloning system in which introduced genes are expressed to give large amounts of polypeptides of the present invention

Screening kits for use in the above described methods form a further aspect of the present invention. Such screening kits comprise:

- (a) a polypeptide of the present invention;
- (b) a recombinant cell expressing a polypeptide of the present invention;
- (c) a cell membrane expressing a polypeptide of the present invention; or
- (d) an antibody to a polypeptide of the present invention;

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

21

which polypeptide is preferably that of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component.

5

Glossary

The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used frequently hereinbefore.

10 "Antibodies" as used herein includes polyclonal and monoclonal antibodies, chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, including the products of an

Fab or other immunoglobulin expression library.

15 "Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state, i.e., if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. Moreover, 20 a polynucleotide or polypeptide that is introduced into an organism by transformation, genetic manipulation or by any other recombinant method is "isolated" even if it is still present in said organism, which organism may be living or non-living.

25 "Polynucleotide" generally refers to any polyribonucleotide (RNA) or polydeoxynucleotide (DNA), which may be unmodified or modified RNA or DNA. "Polynucleotides" include, without limitation, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is 30 a mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The term "polynucleotide" also includes DNAs or RNAs containing one or more modified bases and

DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine. A variety of modifications may be made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides as typically found in nature, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells. "Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often referred to as oligonucleotides.

"Polypeptide" refers to any polypeptide comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres. "Polypeptide" refers to both short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to longer chains, generally referred to as proteins. Polypeptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids.

"Polypeptides" include amino acid sequences modified either by natural processes, such as post-translational processing, or by chemical modification techniques that are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. Modifications may occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present to the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched cyclic polypeptides may result from post-translation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, biotinylation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization,

selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination (see, for instance, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, in *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter *et al.*, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, and Rattan *et al.*, "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

"Fragment" of a polypeptide sequence refers to a polypeptide sequence that is shorter than the reference sequence but that retains essentially the same biological function or activity as the reference polypeptide. "Fragment" of a polynucleotide sequence refers to a polynucleotide sequence that is shorter than the reference sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7..

"Variant" refers to a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, but retains the essential properties thereof. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from the reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from the reference polypeptide. Generally, alterations are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, insertions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. Typical conservative substitutions include Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; and Phe and Tyr. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be naturally occurring such as an allele, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

24.

mutagenesis techniques or by direct synthesis. Also included as variants are polypeptides having one or more post-translational modifications, for instance glycosylation, phosphorylation, methylation, ADP ribosylation and the like. Embodiments include methylation of the N-terminal amino acid, phosphorylations of serines and threonines and modification of C-terminal glycines.

"Allele" refers to one of two or more alternative forms of a gene occurring at a given locus in the genome.

"Polymorphism" refers to a variation in nucleotide sequence (and encoded polypeptide sequence, if relevant) at a given position in the genome within a population.

"Single Nucleotide Polymorphism" (SNP) refers to the occurrence of nucleotide variability at a single nucleotide position in the genome, within a population. An SNP may occur within a gene or within intergenic regions of the genome. SNPs can be assayed using Allele Specific Amplification (ASA). For the process at least 3 primers are required. A common primer is used in reverse complement to the polymorphism being assayed. This common primer can be between 50 and 1500 bps from the polymorphic base. The other two (or more) primers are identical to each other except that the final 3' base wobbles to match one of the two (or more) alleles that make up the polymorphism. Two (or more) PCR reactions are then conducted on sample DNA, each using the common primer and one of the Allele Specific Primers.

"Splice Variant" as used herein refers to cDNA molecules produced from RNA molecules initially transcribed from the same genomic DNA sequence but which have undergone alternative RNA splicing. Alternative RNA splicing occurs when a primary RNA transcript undergoes splicing, generally for the removal of introns, which results in the production of more than one mRNA molecule each of that may encode different amino acid sequences. The term splice variant also refers to the proteins encoded by the above cDNA molecules.

"Identity" reflects a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, determined by comparing the sequences. In general, identity refers to an exact nucleotide to nucleotide or amino acid to amino acid correspondence of

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

25

the two polynucleotide or two polypeptide sequences, respectively, over the length of the sequences being compared.

5
10
15
20
25
30
35

"% identity" - For sequences where there is not an exact correspondence, a "% identity" may be determined. In general, the two sequences to be compared are aligned to give a maximum correlation between the sequences. This may include inserting "gaps" in either one or both sequences, to enhance the degree of alignment. A % identity may be determined over the whole length of each of the sequences being compared (so-called global alignment), that is particularly suitable for sequences of the same or very similar length, or over shorter, defined lengths (so-called local alignment), that is more suitable for sequences of unequal length.

15
20

"Similarity" is a further, more sophisticated measure of the relationship between two polypeptide sequences. In general, "similarity" means a comparison between the amino acids of two polypeptide chains, on a residue by residue basis, taking into account not only exact correspondences between a between pairs of residues, one from each of the sequences being compared (as for identity) but also, where there is not an exact correspondence, whether, on an evolutionary basis, one residue is a likely substitute for the other. This likelihood has an associated "score" from which the "% similarity" of the two sequences can then be determined.

25
30
35

Methods for comparing the identity and similarity of two or more sequences are well known in the art. Thus for instance, programs available in the Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387-395, 1984, available from Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), for example the programs BESTFIT and GAP, may be used to determine the % identity between two polynucleotides and the % identity and the % similarity between two polypeptide sequences. BESTFIT uses the "local homology" algorithm of Smith and Waterman (J Mol Biol, 147,195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482-489, 1981) and finds the best single region of similarity between two sequences. BESTFIT is more suited to comparing two polynucleotide or two polypeptide sequences that are dissimilar in length, the program assuming that the shorter sequence represents a portion of the longer. In comparison, GAP

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

26

aligns two sequences, finding a "maximum similarity", according to the algorithm of Needleman and Wunsch (J Mol Biol. 48, 443-453, 1970). GAP is more suited to comparing sequences that are approximately the same length and an alignment is expected over the entire length. Preferably, the parameters "Gap Weight" and "Length Weight" used in each program are 50 and 3, for polynucleotide sequences and 12 and 4 for polypeptide sequences, respectively. Preferably, % identities and similarities are determined when the two sequences being compared are optimally aligned.

Other programs for determining identity and/or similarity between sequences are also known in the art, for instance the BLAST family of programs (Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997, available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA and accessible through the home page of the NCBI at www.ncbi.nlm.nih.gov) and FASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444-2448, 1988, available as part of the Wisconsin Sequence Analysis Package).

Preferably, the BLOSUM62 amino acid substitution matrix (Henikoff S and Henikoff J G, Proc. Nat. Acad Sci. USA, 89, 10915-10919, 1992) is used in polypeptide sequence comparisons including where nucleotide sequences are first translated into amino acid sequences before comparison.

Preferably, the program BESTFIT is used to determine the % identity of a query polynucleotide or a polypeptide sequence with respect to a reference polynucleotide or a polypeptide sequence, the query and the reference sequence being optimally aligned and the parameters of the program set at the default value, as hereinbefore described.

"Identity Index" is a measure of sequence relatedness which may be used to compare a candidate sequence (polynucleotide or polypeptide) and a reference sequence. Thus, for instance, a candidate polynucleotide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence is identical to the reference sequence except that the candidate polynucleotide sequence

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

27.

may include on average up to five differences per each 100 nucleotides of the reference sequence. Such differences are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion. These differences may occur at
5 the 5' or 3' terminal positions of the reference polynucleotide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In other words, to obtain a polynucleotide sequence having an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence, an average of up to 5
10 in every 100 of the nucleotides of the in the reference sequence may be deleted, substituted or inserted, or any combination thereof, as hereinbefore described. The same applies *mutatis mutandis* for other values of the Identity Index, for instance 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99.

Similarly, for a polypeptide, a candidate polypeptide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polypeptide sequence is identical to the reference sequence except that the polypeptide sequence may include an average of up to five differences per each 100 amino acids of the reference sequence. Such differences
20 are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion. These differences may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either
25 individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In other words, to obtain a polypeptide sequence having an Identity Index of 0.95 compared to a reference polypeptide sequence, an average of up to 5 in every 100 of the amino acids in the reference sequence may be deleted, substituted or inserted, or any combination thereof, as hereinbefore
30 described. The same applies *mutatis mutandis* for other values of the Identity Index, for instance 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99.

The relationship between the number of nucleotide or amino acid differences and the Identity Index may be expressed in the following
35 equation:

$$n_a \leq x_a - (x_a - i),$$

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

28

in which:

n_a is the number of nucleotide or amino acid differences,

x_a is the total number of nucleotides or amino acids in SEQ ID NO:1
and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7 or SEQ
ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8,
respectively,

I is the identity index,

\cdot is the symbol for the multiplication operator, and

in which any non-integer product of x_a and I is rounded down to the
nearest integer prior to subtracting it from x_a .

"Homolog" is a generic term used in the art to indicate a polynucleotide or
polypeptide sequence possessing a high degree of sequence relatedness
to a reference sequence. Such relatedness may be quantified by
determining the degree of identity and/or similarity between the two
sequences as hereinbefore defined. Falling within this generic term are
the terms "ortholog", and "paralog". "Ortholog" refers to a polynucleotide
or polypeptide that is the functional equivalent of the polynucleotide or
polypeptide in another species. "Paralog" refers to a polynucleotide or
polypeptide that within the same species which is functionally similar.

"Fusion protein" refers to a protein encoded by two, unrelated, fused
genes or fragments thereof. Examples have been disclosed in US
5541087, 5726044. In the case of Fc-EphA9, employing an
*immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous
for performing the functional expression of Fc-EphA9 or fragments of -
EphA9, to improve pharmacokinetic properties of such a fusion protein
when used for therapy and to generate a dimeric EphA9. The Fc-EphA9
DNA construct comprises in 5' to 3' direction, a secretion cassette, i.e. a
signal sequence that triggers export from a mammalian cell, DNA
encoding an immunoglobulin Fc region fragment, as a fusion partner, and
a DNA encoding EphA9 or fragments thereof. In some uses it would be
desirable to be able to alter the intrinsic functional properties
(complement binding, Fc-Receptor binding) by mutating the functional Fc*

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

29

sides while leaving the rest of the fusion protein untouched or delete the Fc part completely after expression.

5 All publications and references, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or reference were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as being fully set forth. Any patent application to which
10 this application claims priority is also incorporated by reference herein in its entirety in the manner described above for publications and references.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

30

Claims

1. A polypeptide selected from one of the groups consisting of:

(a) a polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;

(b) a polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;

(c) a polypeptide having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8; and

(d) the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8 and

(e) fragments and variants of such polypeptides in (a) to (d).

2. The polypeptide as claimed in claim 1 comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8.

3. The polypeptide as claimed in claim 1 which is the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8.

4. A polynucleotide selected from one of the groups consisting of:

(a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 95% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

31

(b) a polynucleotide having at least 95% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;

5 (c) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;

10 (d) a polynucleotide having a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 95% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8;

15 (e) an polynucleotide with a nucleotide sequence of at least 100 nucleotides obtained by screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1 or a fragment thereof having at least 15 nucleotides;

(f) a polynucleotide which is the RNA equivalent of a polynucleotide of (a) to (e);

or a polynucleotide sequence complementary to said polynucleotide

20 and polynucleotides that are variants and fragments of the above mentioned polynucleotides or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.

5. A polynucleotide as claimed in claim 4 selected from the group consisting of:

25 (a) a polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;

(b) the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and/or SEQ ID NO:3 and/or SEQ ID NO:5 and/or SEQ ID NO:7;

30 (c) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8; and

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

32

(d) a polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4 and/or SEQ ID NO:6 and/or SEQ ID NO:8.

5 6. An expression system comprising a polynucleotide capable of producing a polypeptide of claim 1 when said expression vector is present in a compatible host cell.

7. A recombinant host cell comprising the expression vector of claim 6 or a membrane thereof expressing the polypeptide of claim 1.

10 8. A process for producing a polypeptide of claim 1 comprising the step of culturing a host cell as defined in claim 7 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering the polypeptide from the culture medium.

15 9. A fusion protein consisting of the Immunoglobulin Fc-region and any one polypeptide of claim 1.

20 10. An antibody immunospecific for the polypeptide of any one of claims 1 to 3.

11. A method for screening to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide of claim 1 comprising a method selected from the group consisting of:

25 (a) measuring or, detecting, quantitatively or qualitatively, the binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound;

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

33

- (b) measuring the competition of binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof in the presence of a labeled competitor;
- 5 (c) testing whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells or cell membranes expressing the polypeptide;
- 10 (d) mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of claim 1, to form a mixture, measuring activity of the polypeptide in the mixture, and comparing the activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound; or
- (e) detecting the effect of a candidate compound on the production of mRNA encoding said polypeptide or said polypeptide in cells, using for instance, an ELISA assay, and
- 15 (f) producing said compound according to biotechnological or chemical standard techniques.

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

1/23

SEQUENCE LISTING

5 <110> Messerk Patent GmbH
 □
 □
 <120> Novel protein of the EphA receptor family
 10 □
 □
 <130> EphA9kcdws
 □
 15 □
 □
 <140>
 □
 <141>
 20 □
 □
 <160> 8
 □
 25 □
 □
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 □
 <210> 1
 30 <211> 2955
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 □
 <220>
 35 <221> CDS
 <222> (1)..(2925)
 <223> Full length kinase
 □
 <400> 1
 40 atc ctc ctg gat tcc aaa gcc tcc cag gcc gag ctg gcc tgg act gca 48
 ile leu leu asp ser lys ala ser glr ala glu leu gly trp thr ala
 5 10 15
 ctg cca agt aat ggg tgg gag gag atc agc ggc gtg gat gaa cac gac 96
 45 leu pro ser asn gly trp glu glu ile ser gly val asp glu his asp
 20 25 30
 cgt ccc atc cgc acg tac caa gtg tgc aat gtg ctg gag cca aac cag 144
 50 arg pro ile arg thr tyr glr val cys asn val leu glu pro asn gln
 35 40 45
 gac aac tgg ctg cag act ggc tgc ata agc cgt ggc tgc ggg cag cgc 192
 asp asn trp leu gln thr gly trp ile ser arg gly arg gly gln arg
 50 55 60
 55 atc ttc gtg gaa ctg cag ttc aca ctc cgt gac tgc agc agc atc cct 240
 ile phe val glu leu gln phe thr leu arg asp cys ser ser ile pro
 65 70 75 80
 60 ggc gcc gcg ggt acc tgc aag gag acc ttc aac gtc tac tac ctg gaa 288

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

2/23

Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu
85 90 95

act gag gcc gac ctg ggc cgt ggg cgt ccc gcc cta ggc gcc agc cgg 336
5 Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg
100 105 110

ccc cgc aaa atc gac acg atc gcg gcg gac gag agc ttc acg cag gcc 384
10 Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Gly
115 120 125

gac ctg gct gag cgc aag atg aag ctg aac aca gag gtc cgc gag atc 432
15 Asp Leu Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Thr Val Arg Glu Ile
130 135 140

gga ccg ctc agc cgg cgg gct ttc cac ctg gcc ttt cag gac gtg gcc 480
15 Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly
145 150 155 160

gca tgc gtg gcg ctt gtc tcc gtc cgc gtc tac tac aag cag tgc cgc 528
20 Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Gln Cys Arg
165 170 175

gcc acc gtg cgg gcc ctg gcc acg ttc cca gcc acc gca gcc gag agc 576
25 Ala Thr Val Arg Gly Leu Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser
180 185 190

gcc ttc tcc aca cgg gtc gaa gtg gcc gga acg tgc gtc gcg cac tcc 624
30 Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser
195 200 205

gaa ggc gag cct gcc agc ccc cca cgc atg cac tgc gcc gcc gac gcc 672
35 Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly
210 215 220

gag tgg cng gtc cct gtc ggc cgc tgc agc tgc agc gcg ggc ttc cag 720
40 Glu Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln
225 230 235 240

gag cgt ggt gac ttc tgc gaa gcc tgt ccc cca ggg ttt tac aag gtg 768
40 Glu Arg Gly Asp Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val
245 250 255

ken ccg cgg cgg ccc ctc tgc tca ccg tgc cca gag cac agc cgg gcc 816
45 Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala
260 265 270

ctg gaa aac gcc tcc acc ttc tgc gtg tgc cag gac agc tat gcc cgc 864
50 Leu Glu Asn Ala Ser Thr Phe Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg
275 280 285

tca ccc acc gac ccg ccc tgg gct tca tgc acc cgg ccg ccg tgg gcc 912
55 Ser Pro Thr Asp Pro Pro Ser Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala
290 295 300

ccg cgg gac ctg caq tac agc ctg agc cgc tgc ccg ctg gtg ctg cga 960
60 Pro Arg Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg
305 310 315 320

ctg cgc tgg ctg ccg ccg gcc gac tgc gga gcc cgc tgc gac gtc acc 1008
60 Leu Arg Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

4/23

aaa gtc cca aca cgt cgc aca ttc ctg gac ccc cag agc tgt ggg gac 1776
 Lys Val Pro Thr Arg Arg Thr Phe Leu Asp Pro Gln Ser Cys Gly Asp
 580 585 590
 5 ctg ctg cag gct gtg cat ctg ttc gcc aag gaa ctg gat gcg aaa agc 1824
 Leu Leu Gln Ala Val His Leu Phe Ala Lys Glu Leu Asp Ala Lys Ser
 595 600 605
 10 gtc acg ctg gag agg agc ctt gga gga ggg cgg ttt ggg gag ctg tgc 1872
 Val Thr Leu Glu Arg Ser Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Glu Leu Cys
 610 615 620
 15 tgc ggc tgc ttg cag ctc ccc ggt cgc cag gag ctg ctc gta gcc gtg 1920
 Cys Gly Cys Leu Gln Leu Pro Gly Arg Gln Glu Leu Leu Val Ala Val
 625 630 635 640
 20 cat atg ctg agg gac agc gcc tcc gac tca cag agg ctc ggc ttc ctg 1968
 His Met Leu Arg Asp Ser Ala Ser Asp Ser Gln Arg Leu Gly Phe Leu
 645 650 655
 25 gcc gag gcc ctc acg ctg ggc cag ttt gac cat agc cac atc gtg cgg 2016
 Ala Glu Ala Leu Thr Leu Gly Gln Phe Asp His Ser His Ile Val Arg
 660 665 670
 30 ctg gag ggc gtt gtt acc cga ggt agg gcc cgc acc ttg atg att gtc 2064
 Leu Glu Gly Val Val Thr Arg Gly Arg Ala Arg Thr Leu Met Ile Val
 675 680 685
 35 acc gag tac atg agc cat ggg gcc ctg gac gcc ttc ctc agg cgg cac 2112
 Thr Glu Tyr Met Ser His Gly Ala Leu Asp Gly Phe Leu Arg Arg His
 690 695 700
 40 gag ggg cag ctg gtg gct ggg caa ctg atg ggg ttg ctg cct ggg ctg 2160
 Glu Gly Gln Leu Val Ala Gly Gln Leu Met Gly Leu Leu Pro Gly Leu
 705 710 715 720
 45 gca cca gcc ctg gag tat ctg tca gag atg ggc tac gtt cao cgg gcc 2208
 Ala Ser Ala Met Lys Tyr Leu Ser Glu Met Gly Tyr Val His Arg Gly
 725 730 735
 50 ctg gca gct cgc cat gtg ctg gtc agc agc gac ctt gtc tgc aag atc 2256
 Leu Ala Ala Arg His Val Leu Val Ser Ser Asp Leu Val Cys Lys Ile
 740 745 750
 55 tcl ggc ttc ggg cgc gcc ccc cgc gac cga tca gag gcl gtc tac acc 2304
 Ser Gly Phe Gly Arg Gly Pro Arg Asp Arg Ser Glu Ala Val Tyr Thr
 755 760 765
 60 acf atg agt ggc cgg agc cca gcg cta tgc gcc gcl ccc gag aca ott 2352
 Thr Met Ser Gly Arg Ser Pro Ala Leu Trp Ala Ala Pro Glu Thr Leu
 770 775 780
 65 cag ttt gcc ccc ttc agc tct gcc agt gac gtg tgg agc ttc gcc atc 2400
 Gln Phe Gly His Phe Ser Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile
 785 790 795 800
 70 atc atg tgg gag gtg atg gcc ttt ggg gag cgg cct tac tgg gac atg 2448
 Ile Met Trp Glu Val Met Ala Phe Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met
 805 810 815

WO 02/08253

ECT/EP01/08210

5/23

tct ggc caa gac gtg atc aag gct gtg gag gat ggc ttc cgg ctg cca 2496
 Ser Gly Gln Asp Val Ile Lys Ala Val Glu Asp Gly Phe Arg Leu Pro
 820 825 830

5 ccc ccc agg aac tgt cct aac ctt ctg cac cga cta atg ctc gac tgc 2544
 Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asn Leu Leu His Arg Leu Met Leu Asp Cys
 835 840 845

10 tgg cag aag gac cca ggt gag cgg ccc agg ttc tcc cag atc cac agc 2592
 Trp Gln Lys Asp Pro Gly Glu Arg Pro Arg Phe Ser Glc Ile His Ser
 850 855 860

atc ctg agc aag atg gtg cag gac cca gag ccc ccc aag tgt gcc ctg 2640
 Ile Leu Ser Lys Met Val Gln Asp Pro Glu Pro Pro Lys Cys Ala Leu
 865 870 875

15 act acc tgt ccc agg cct ccc acc cca cta gcg gac cgt gcc ttc tcc 2688
 Thr Thr Cys Pro Arg Pro Pro Thr Pro Leu Ala Asp Arg Ala Phe Ser
 885 890 895

20 acc ttc ccc tcc ttt ggc tct gtg ggc ggc tgg ctg gag gcc ctg gac 2736
 Thr Phe Pro Ser Phe Gly Ser Val Gln Ala Trp Leu Glu Ala Leu Asp
 900 905 910

25 atg tgc cgc tac aag gac agc ttc gcg gct gct gcc tac ggg agc ctg 2784
 Leu Cys Arg Tyr Lys Asp Ser Phe Ala Ala Ala Gly Tyr Gly Ser Leu
 915 920 925

30 gag gcc gtg gcc gag atg act gcc cag gac ctg gtg agc cta ggc atc 2832
 Glu Ala Val Ala Glu Met Thr Ala Gln Asp Leu Val Ser Leu Gly Ile
 930 935 940

tct ctg gct gaa cat cga gag gcc ctc ctc agc ggg atc agc gcc ctg 2880
 Ser Leu Ala Glu His Arg Glu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ser Ala Leu
 945 950 955

35 cag gca cga gtg ctg cag ctg cag gcc cag ggg gtg cag gtg tga 2925
 Gln Ala Arg Val Leu Gln Leu Gln Gly Gln Gly Val Gln Val
 965 970 975

40 gtggaccccc tcttcccaag gcaggactcc 2955

<213> 2
 <211> 974
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 50 Ile Leu Leu Asp Ser Lys Ala Ser Gln Ala Glu Asn Gly Trp Thr Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Ser Asn Gly Trp Glu Gln Ile Ser Gly Val Asp Glu His Asp
 20 25 30
 Arg Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Leu Glu Pro Asn Gln
 35 40 45
 55 Asp Asn Trp Leu Gln Thr Gly Trp Ile Ser Arg Gly Arg Gly Gln Arg
 50 55 60
 Ile Phe Val Glu Leu Gln Phe Thr Leu Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro
 65 70 75 80
 60 Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu
 85 90 95

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

6/23

Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg
100 105 110
Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Gly
115 120 125
5 Asp Leu Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Glu Val Arg Glu Ile
130 135 140
Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly
145 150 155 160
Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Gln Cys Arg
165 170 175
10 Ala Thr Val Arg Gly Leu Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser
180 185 190
Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser
195 200 205
15 Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly
210 215 220
Glu Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln
225 230 235 240
20 Glu Arg Gly Asp Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val
245 250 255
Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala
260 265 270
Leu Glu Asn Ala Ser Thr Phe Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg
275 280 285
25 Ser Pro Thr Asp Pro Pro Ser Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala
290 295 300
Pro Arg Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg
305 310 315 320
Leu Arg Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr
325 330 335
30 Tyr Ser Leu Leu Cys Leu Arg Cys Gly Arg Glu Gly Pro Ala Gly Ala
340 345 350
Cys Glu Pro Cys Gly Pro Arg Val Ala Phe Leu Pro Arg Gln Ala Gly
355 360 365
35 Leu Arg Glu Arg Ala Ala Thr Leu Leu His Leu Arg Pro Gly Ala Arg
370 375 380
Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Leu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ala Ala
385 390 395 400
Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Pro Gly
405 410 415
40 Ala Pro Trp Glu Glu Asp Glu Ile Arg Arg Asp Arg Val Glu Pro Gln
420 425 430
Ser Val Ser Leu Ser Trp Arg Glu Pro Ile Pro Ala Gly Ala Pro Gly
435 440 445
45 Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Arg Tyr Tyr Glu Lys Gly Gln Ser
450 455 460
Glu Gln Thr Tyr Ser Met Val Lys Thr Gly Ala Pro Thr Val Thr Val
465 470 475 480
Thr Asn Leu Lys Pro Ala Thr Arg Tyr Val Phe Gln Ile Arg Ala Ala
485 490 495
50 Ser Pro Gly Pro Ser Trp Glu Ala Gln Ser Phe Asn Pro Ser Ile Glu
500 505 510
Val Gln Thr Leu Gly Glu Ala Ala Ser Gly Ser Arg Asp Gln Ser Pro
515 520 525
55 Ala Ile Val Val Thr Val Val Thr Ile Ser Ala Leu Leu Val Leu Gly
530 535 540
Ser Val Met Ser Val Leu Ala Ile Trp Arg Arg Pro Cys Ser Tyr Gly
545 550 555 560
Lys Gly Gly Gly Asp Ala His Asp Glu Glu Glu Leu Tyr Phe His Phe
565 570 575
60 Lys Val Pro Thr Arg Arg Thr Phe Leu Asp Pro Gln Ser Cys Gly Asp

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

7/23

580 585 590
 Leu Leu Gln Ala Val His Leu Phe Ala Lys Glu Leu Asp Ala Lys Ser
 595 600 605
 Val Thr Leu Glu Arg Ser Leu Gly Gly Arg Phe Gly Glu Leu Cys
 610 615 620
 5 Cys Gly Cys Leu Gln Leu Pro Gly Arg Gln Glu Leu Val Ala Val
 625 630 635 640
 His Met Leu Arg Asp Ser Ala Ser Asp Ser Gln Arg Leu Gly Phe Leu
 645 650 655
 10 Ala Glu Ala Leu Thr Leu Gly Gln Phe Asp His Ser His Ile Val Arg
 660 665 670
 Leu Glu Gly Val Val Thr Arg Gly Arg Ala Arg Thr Leu Met Ile Val
 675 680 685
 Thr Glu Tyr Met Ser His Gly Ala Leu Asp Gly Phe Leu Arg Arg His
 690 695 700
 15 Glu Gly Gln Leu Val Ala Gly Gln Leu Met Gly Leu Leu Pro Gly Leu
 705 710 715 720
 Ala Ser Ala Met Lys Tyr Leu Ser Glu Met Gly Tyr Val His Arg Gly
 725 730 735
 20 Leu Ala Ala Arg His Val Leu Val Ser Ser Asp Leu Val Cys Lys Ile
 740 745 750
 Ser Gly Phe Gly Arg Gly Pro Arg Asp Arg Ser Glu Ala Val Tyr Thr
 755 760 765
 Thr Met Ser Gly Arg Ser Pro Ala Leu Trp Ala Ala Pro Glu Thr Leu
 770 775 780
 25 Gln Phe Gly His Phe Ser Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile
 785 790 795 800
 Ile Met Trp Glu Val Met Ala Phe Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met
 805 810 815
 30 Ser Gly Gln Asp Val Ile Lys Ala Val Glu Asp Gly Phe Arg Leu Pro
 820 825 830
 Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asn Leu Leu His Arg Leu Met Leu Asp Cys
 835 840 845
 Trp Gln Lys Asp Pro Gly Glu Arg Pro Arg Phe Ser Gln Ile His Ser
 850 855 860
 35 Ile Leu Ser Lys Met Val Gln Asp Pro Glu Pro Pro Lys Cys Ala Leu
 865 870 875 880
 Thr Thr Cys Pro Arg Pro Pro Thr Pro Leu Ala Asp Arg Ala Phe Ser
 885 890 895
 40 Thr Phe Pro Ser Phe Gly Ser Val Gly Ala Trp Leu Glu Ala Leu Asp
 900 905 910
 Leu Cys Arg Tyr Lys Asp Ser Phe Ala Ala Ala Gly Tyr Gly Ser Leu
 915 920 925
 45 Glu Ala Val Ala Gln Met Thr Ala Gln Asp Leu Val Ser Leu Gly Ile
 930 935 940
 Ser Leu Ala Glu His Arg Gln Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ser Ala Leu
 945 950 955 960
 Gln Ala Arg Val Leu Gln Leu Gln Gly Gln Gly Val Gln Val
 965 970

50
 <210> 3
 <211> 5099
 55 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 60 <222> (1)..(3069)
 <223> Extended full length kinase

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

8/23

```

<400> 3
atc ctc ctg gat tcc aaa gcc tcc cag gcc gag ctg ggc tgg act gca 48
Ile Leu Leu Asp Ser Lys Ala Ser Gln Ala Glu Leu Gly Trp Thr Ala
5 1 5 10 15
ctg cca agt aat ggg tgg gag gag atc agc gcc gtg gat gaa cac gac 96
Leu Pro Ser Asn Gly Trp Glu Glu Ile Ser Gly Val Asp Glu His Asp
10 20 25 30
cgt ccc atc cgc acg tac caa gtg tgc aat gtg ctg gag ccc aac cag 144
Arg Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Leu Glu Pro Asn Gln
15 35 40 45
gac aac tgg ctg cag act ggc tgg ata aac cgt gcc cgc ggg cag cgc 192
Asp Asn Trp Leu Gln Thr Gly Trp Ile Ser Arg Gly Arg Gly Gln Arg
20 50 55 60
atc ttc gtg gaa ctg cag ttc aca ctg cgt gac tgc agc agc atc cct 240
Ile Phe Val Glu Leu Gln Phe Thr Leu Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro
25 65 70 75
ggc gcc gcg ggt acc tgc aag gag acc ttc aac gtc tac tac ctg gaa 288
Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu
30 85 90 95
act gag gcc gac ctg gcc cgt ggg cgt gcc cgc cta ggc gcc agc cgg 336
Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg
35 100 105 110
ccc cgc aaa atc gac acg atc gcc gcg gac gag agc ttc acg cag gcc 384
Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Gly
40 115 120 125
gac ctg ggt gag cgc aag atg aag ctg aac aca gag gtg cgc gag atc 432
Asp Leu Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Glu Val Arg Glu Ile
45 130 135 140
gga cgc ctg agc cgg cgg ggt ttc cac cag gcc ttt cag gac ctg gcc 480
Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly
50 145 150 155
gaa tgc gtg gcc ctg gtc tgg gtg cgc gtc tac tac aag cag tgc cgc 528
Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Gln Cys Arg
55 165 170 175
gcc acc gtc cgg gcc ctg gcc acg ttc cca gcc acc gca gcc gag agc 576
Ala Thr Val Arg Gly Leu Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser
60 180 185 190
gcc ttc tcc aca ctg gtg gaa gtg gcc gca agc tgc gtg cgc cac tcy 624
Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser
65 195 200 205
gaa ggg gcg cct gcc agc ccc cca cgc atg cac tgc gcc gcc gac gcc 672
Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly
70 210 215 220
gag tgg ctg gtg cct gtg gcc cgc tgc acc tgc agc gcc gga ttc cag 720
Glu Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln
75 225 230 235

```

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

9/23

	gag cgt ggt gac ttc tgc gaa gcc tgt ccc cca ggg ttt tac aag gtg	768
	Glu Arg Gly Asp Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val	
	245	250
5	ccc ccg cgg cgg ccc ctc tgc tca ccg tgc cca gag cac agc cgg gcc	816
	Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala	
	260	265
10	ctg gaa aac gcc tcc acc ttc tgc gtg tgc cag gac agc tat gcg cgc	864
	Leu Glu Asn Ala Ser Thr Phe Ser Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg	
	275	280
15	tca ccc acc gac ccg ccc tgg gct tcc tgc acc cgg ccg ccg tgg cgg	912
	Ser Pro Thr Asp Pro Pro Pro Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala	
	290	295
20	ccg cgg gac ctg cag tac agc ctg agc cgc tgg ccg ctg gtg ctg cgs	960
	Pro Arg Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg	
	305	310
	ctg cgc tgg ctg ccg ccg gcc gac tgg gga ggc cgc tgg gac gtc acc	1008
	Leu Arg Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr	
	325	330
25	tac tgg ctg ctg tgc ctg cgc tgc ggc cgc gag ggc ccg gcg ggc gcc	1056
	Tyr Ser Leu Leu Cys Leu Arg Cys Gly Arg Glu Gly Pro Ala Gly Ala	
	340	345
30	tgc gag ccg tgc ggg ccg cgc gtg gcc ttc cta ccg cga cag gca cgg	1104
	Cys Glu Pro Cys Gly Pro Arg Val Ala Phe Leu Pro Arg Gln Ala Gly	
	355	360
35	ctg cgg gag cga gcc gcc acg ctg ctg cac ctg cgg ccc ggc gcg cgc	1152
	Leu Arg Glu Arg Ala Ala Thr Leu Leu His Leu Arg Pro Gly Ala Arg	
	370	380
40	tac acc gtg cgc gtc gcc gcg ctc aac gcc gtc tgg gcc ccg ccg gcc	1200
	Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Leu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ala Ala	
	385	390
45	gcc gcg gga acc acc tac gcg cag gtc acc gtc tcc acc cgg ccc ggg	1248
	Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Pro Gly	
	405	410
	ggc ccc tgg gag gag gat gag atc cgc agg gac cga gtc gaa ccc cag	1296
	Ala Pro Trp Glu Glu Asp Gln Ile Arg Arg Asp Arg Val Glu Pro Gln	
	420	425
50	agc gtg tcc ctg tgg tgg cgg gag ccc atc cct gcc gga gcc cct cgg	1344
	Ser Val Ser Leu Ser Trp Arg Glu Pro Ile Pro Ala Gly Ala Pro Gly	
	435	440
55	gcc aat gac acg gag tac gag atc cga tac tac gag aag ggt cag gct	1392
	Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Arg Tyr Tyr Glu Lys Gly Gln Ser	
	450	455
60	gac cag act tac tcc atg gtg aag aca ggg gcg ccc aca gtc acc gtc	1440
	Glu Gln Thr Tyr Ser Met Val Lys Thr Gly Ala Pro Thr Val Thr Val	
	465	470
		475
		480

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

10/23

	acc aac ctg aag cag gcc acc cgc tac gtc ttt cag atc cgg gcc gct	1488
	Thr Asn Leu Lys Pro Ala Thr Arg Tyr Val Phe Gln Ile Arg Ala Ala	
	485 490 495	
5	tcc cag ggg cca tcc tgg gag gcc cag agt ttt aac ccc agc att gaa	1536
	Ser Pro Gly Pro Ser Trp Glu Ala Gln Ser Phe Asn Pro Ser Ile Glu	
	500 505 510	
10	gta cag acc ctg ggg gag gcc gcc tca ggg tcc agc gac cag agc ccc	1584
	Val Gln Thr Leu Gly Glu Ala Ala Ser Gly Ser Arg Asp Gln Ser Pro	
	515 520 525	
	gcc att gtc gtc acc gta gty acc atc tcc gcc ctc ctc gtc ctg ggc	1632
	Ala Ile Val Val Thr Val Val Thr Ile Ser Ala Leu Leu Val Leu Gly	
15	530 535 540	
	tcc ctg atg agt gtc ctg gcc att tgg agg agg ccc tgc agc tat gcc	1680
	Ser Val Met Ser Val Leu Ala Ile Trp Arg Arg Pro Cys Ser Tyr Gly	
	545 550 555 560	
20	aaa gga gga ggg gat gcc cat gat gaa gag gag ctg tat ttc cac tgt	1728
	Lys Gly Gly Gly Asp Ala His Asp Glu Glu Glu Leu Tyr Phe His Cys	
	565 570 575	
25	gag tgg gct ggg cct ggc tgg sga sgg gcc ggc tcc acc ctg cct cac	1776
	Glu Leu Ala Gly Pro Gly Trp Gly Gly Ala Gly Ser Thr Leu Pro His	
	580 585 590	
	tcc tca gcc ctc tgc ctt gct aca ctg cat gag ccc gct tgt cag ccc	1824
	Ser Ser Ala Leu Cys Leu Ala Thr Ser His Glu Pro Ala Cys Gln Pro	
	595 600 605	
	cag tgg tgg agg ccc cat tcc tca gcc tca tct ctt tct ctc cca gtc	1872
	Gln Trp Trp Arg Pro His Ser Ser Gly Ser Ser Leu Ser Leu Pro Val	
35	610 615 620	
	aaa gtc cca aca cgt cgc aca ttc ctg gac ccc cag agc tgt ggg gcc	1920
	Lys Val Pro Thr Arg Arg Thr Phe Leu Asp Pro Gln Ser Cys Gly Asp	
	625 630 635 640	
40	ctg ctg aag gct gtc cat ctg ttc gcc aag gaa ctg gat gcc aaa agc	1968
	Leu Leu Gln Ala Val His Leu Phe Ala Lys Glu Leu Asp Ala Lys Ser	
	645 650 655	
45	gtc acg ctg gag agg agc ctt gga gga ggg cgg ttt ggg gag ctg tgc	2016
	Val Thr Leu Glu Arg Ser Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Glu Leu Cys	
	660 665 670	
	tgt gcc tgc ttg cag ctc ccc ggt cgc cag gag ctg ctc gta gcc gtc	2064
	Cys Gly Cys Leu Gln Leu Pro Gly Arg Gln Glu Leu Leu Val Ala Val	
50	675 680 685	
	cat atg ctg agg gac agc gcc tcc gcc tca cag agg ctc gcc ttc ctg	2112
	His Met Leu Arg Asp Ser Ala Ser Asp Ser Gln Arg Leu Gly Phe Leu	
	690 695 700	
	gcc gag gcc ctc acg ctg ggc cag ttt gac cat agc cac atc gtc cgg	2160
	Ala Glu Ala Leu Thr Leu Gly Gln Phe Asp His Ser His Ile Val Arg	
	705 710 715 720	
60	ctg gag gcc gtt gtt acc cga ggt agg gcc cgc acc ttg atg att gtc	2208

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

11/23

	Leu	Glu	Gly	Val	Val	Thr	Arg	Gly	Arg	Ala	Arg	Thr	Leu	Met	Ile	Val		
					725						730				735			
5	acc	gag	tac	atg	agc	cat	ggg	gcc	ctg	gac	ggc	ttc	ctc	agg	cgg	cac	2256	
	Thr	Glu	Tyr	Met	Ser	His	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Gly	Phe	Leu	Arg	Arg	His	
				740					745					750				
10	gag	ggg	cag	ctg	gtg	gct	ggg	caa	ctg	atg	ggg	tgg	ctg	cct	ggg	ctg	2304	
	Glu	Gly	Gln	Leu	Val	Ala	Gly	Gln	Leu	Met	Gly	Leu	Leu	Pro	Gly	Leu		
			755					760					765					
15	gca	tca	gcc	atg	aag	tat	ctg	tca	gag	atg	ggc	tac	gtt	caa	cgg	ggc	2352	
	Ala	Ser	Ala	Met	Lys	Tyr	Leu	Ser	Glu	Met	Gly	Asp	Tyr	Val	His	Arg	Gly	
			770				775					780						
20	ctg	gca	gct	cgc	cat	ctg	ctg	gtc	agc	agc	gac	ctt	gtc	tgc	aag	atc	2400	
	Leu	Ala	Ala	Arg	His	Val	Leu	Val	Ser	Ser	Asp	Leu	Val	Cys	Phe	Ile		
			785			790					795				800			
25	tct	ggc	ttc	ggg	cgg	ggc	ccc	agg	gac	cga	tca	gag	gct	gtc	tac	acc	2448	
	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Gly	Pro	Arg	Asp	Arg	Ser	Glu	Ala	Val	Tyr	Thr		
				805					810					815				
30	act	atg	agt	ggc	cgg	agc	cca	ggg	cha	tgg	goc	gct	ccc	gag	aca	ctt	2496	
	Thr	Met	Ser	Gly	Arg	Ser	Pro	Ala	Leu	Trp	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	Leu		
				820				825					830					
35	cag	ttt	ggc	caac	tcc	agc	tct	ggc	agt	gac	gtg	tgg	agc	tcc	ggc	atc	2544	
	Gln	Phe	Gly	His	Phe	Ser	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Ile		
			835				840					845						
40	acc	atg	tgg	ggc	gtg	atg	goc	ttt	cgg	gag	cgg	cct	tac	tgg	gac	atg	2592	
	Ile	Met	Trp	Glu	Val	Met	Ala	Phe	Gly	Glu	Arg	Pro	Tyr	Trp	Asp	Met		
			850				855					860						
45	tct	ggc	caa	goc	ctg	atc	aag	gct	gtg	gag	gat	ggc	tcc	cgg	ctg	cca	2640	
	Ser	Gly	Gln	Asp	Val	Ile	Lys	Ala	Val	Glu	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Pro		
			865			870				875					880			
50	ccc	ccc	agg	aac	tgt	cct	aac	ctt	ctg	cac	cga	cta	atg	ctc	gac	tgc	2688	
	Pro	Pro	Arg	Asn	Cys	Pro	Asn	Leu	Leu	His	Arg	Leu	Met	Leu	Asp	Cys		
				885					890					895				
55	tgg	cag	aag	gac	cca	ggt	gag	cgg	ccc	agg	ttc	tcc	cag	atc	cac	agc	2736	
	Trp	Gln	Lys	Asp	Pro	Gly	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser	Gln	Ile	His	Ser		
				900					905					910				
60	atc	ctg	agc	aag	atg	ggg	cag	gac	cca	gag	ccc	ccc	aag	tgt	goc	ctg	2784	
	Ile	Leu	Ser	Lys	Met	Val	Gln	Asp	Pro	Glu	Pro	Pro	Lys	Cys	Ala	Leu		
			915				920					925						
65	act	acc	tgt	ccc	agg	cct	ccc	acc	cca	cta	ggc	gac	cgt	goc	ttc	tcc	2832	
	Thr	Thr	Cys	Phe	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Ala	Asp	Arg	Ala	Phe	Ser		
			930				935					940						
70	acc	tcc	ccc	tcc	ttt	ggc	tct	gtg	ggc	ggg	tgg	ctg	gag	goc	ctg	gac	2880	
	Thr	Phe	Pro	Ser	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Leu	Asp		
				945		950					955				960			
75	ctg	tgc	cgc	tac	aag	gac	agc	ttc	ggg	gct	gct	ggc	tat	ggg	agc	ctg	2928	
	Leu	Cys	Arg	Tyr	Lys	Asp	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	Gly	Tyr	Gly	Ser	Leu		

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

12/23

	965	970	975	
	gag gcc gtg gcc gag atg act gcc cag gac ctg gtg ago cta ygc atc			2976
5	Glu Ala Val Ala Glu Met Thr Ala Gln Asp Leu Val Ser Leu Gly Ile			
	980	985	990	
	tct ttg gct gaa cat cga gag gcc ctg ctg agc ggg atc agc gcc ctg			3024
	Ser Leu Ala Glu His Arg Glu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ser Ala Leu			
10	995	1000	1005	
	cag gca cga gtg ctg cag ctg cag ggc cag ggg gtg cag gtg tga			3069
	Gln Ala Arg Val Leu Gln Leu Gln Gly Gln Gly Val Gln Val			
	1010	1015	1020	
15	gtggaccoca ttcctccaag gcaggactcc			3099
	<210> 4			
	<211> 1022			
20	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 4			
	Ile Leu Leu Asp Ser Lys Ala Ser Gln Ala Glu Leu Gly Trp Thr Ala			
25	1 5 10 15			
	Leu Pro Ser Asn Gly Trp Glu Glu Ile Ser Gly Val Asp Glu His Asp			
	20 25 30			
	Arg Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Leu Glu Pro Asn Gln			
30	35 40 45 50			
	Asp Asn Trp Leu Gln Thr Gly Trp Ile Ser Arg Gly Arg Gly Gln Arg			
	55 60 65 70			
	Ile Phe Val Glu Leu Gln Phe Thr Leu Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro			
	75 80 85 90			
	Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu			
35	95 100 105 110			
	Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg			
	115 120 125 130			
	Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Gly			
40	135 140 145 150			
	Asp Leu Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Glu Val Arg Glu Ile			
	155 160 165 170			
	Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly			
	175 180 185 190			
	Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Gln Cys Arg			
45	195 200 205 210			
	Ala Thr Val Arg Gly Leu Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser			
	215 220 225 230			
	Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser			
50	235 240 245 250			
	Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly			
	255 260 265 270			
	Gln Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln			
	275 280 285 290			
	Glu Arg Gly Asp Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val			
55	295 300 305 310			
	Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala			
	315 320 325 330			
	Leu Glu Asn Ala Ser Thr Phe Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg			
60	335 340 345 350			
	Ser Pro Thr Asp Pro Pro Ser Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala			

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

13/23

Pro Arg Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg
305 310 315 320
Leu Arg Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr
325 330 335
5 Tyr Ser Leu Leu Cys Leu Arg Cys Gly Arg Glu Gly Pro Ala Gly Ala
340 345 350
Cys Glu Pro Cys Gly Pro Arg Val Ala Phe Leu Pro Arg Gln Ala Gly
355 360 365
10 Leu Arg Glu Arg Ala Ala Thr Leu Leu His Leu Arg Pro Gly Ala Arg
370 375 380
Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Leu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ala Ala
385 390 395 400
Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Pro Gly
405 410 415
15 Ala Pro Trp Glu Glu Asp Glu Ile Arg Arg Asp Arg Val Glu Pro Gln
420 425 430
Ser Val Ser Leu Ser Trp Arg Glu Pro Ile Pro Ala Gly Ala Pro Gly
435 440 445
20 Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Arg Tyr Tyr Glu Lys Gly Gln Ser
450 455 460
Glu Gln Thr Tyr Ser Met Val Lys Thr Gly Ala Pro Thr Val Thr Val
465 470 475 480
Thr Asn Leu Lys Pro Ala Thr Arg Tyr Val Phe Gln Ile Arg Ala Ala
485 490 495
25 Ser Pro Gly Pro Ser Trp Glu Ala Gln Ser Phe Asn Pro Ser Ile Glu
500 505 510
Val Gln Thr Leu Gly Glu Ala Ala Ser Gly Ser Arg Asp Gln Ser Pro
515 520 525
30 Ala Ile Val Val Thr Val Val Thr Ile Ser Ala Leu Leu Val Leu Gly
530 535 540
Ser Val Met Ser Val Leu Ala Ile Trp Arg Arg Pro Cys Ser Tyr Gly
545 550 555 560
Lys Gly Gly Gly Asp Ala His Asp Glu Glu Glu Leu Tyr Phe His Cys
565 570 575
35 Glu Leu Ala Gly Pro Gly Trp Gly Gly Ala Gly Ser Thr Leu Pro His
580 585 590
Ser Ser Ala Leu Cys Leu Ala Thr Leu His Glu Pro Ala Cys Gln Pro
595 600 605
40 Gln Trp Trp Arg Pro His Ser Ser Gly Ser Ser Leu Ser Leu Pro Val
610 615 620
Lys Val Pro Thr Arg Arg Thr Phe Leu Asp Pro Gln Ser Cys Gly Asp
625 630 635 640
Ser Leu Gln Ala Val His Leu Phe Ala Lys Glu Leu Asp Ala Lys Ser
645 650 655
45 Val Thr Leu Glu Arg Ser Leu Gly Gly Gly Arg Phe Gly Glu Leu Cys
660 665 670
Cys Gly Cys Leu Gln Leu Pro Gly Arg Gln Glu Leu Leu Val Ala Val
675 680 685
50 His Met Leu Arg Asp Ser Ala Ser Asp Ser Gln Arg Leu Gly Phe Leu
690 695 700
Ala Glu Ala Leu Thr Leu Gly Gln Phe Asp His Ser His Ile Val Arg
705 710 715 720
Leu Glu Gly Val Val Thr Arg Gly Arg Ala Arg Thr Leu Met Ile Val
725 730 735
55 Thr Glu Tyr Met Ser His Gly Ala Leu Asp Gly Phe Leu Arg Arg His
740 745 750
Glu Gly Gln Leu Val Ala Gly Gln Leu Met Gly Leu Leu Pro Gly Leu
755 760 765
60 Ala Ser Ala Met Lys Tyr Leu Ser Glu Met Gly Tyr Val His Arg Gly
770 775 780
Leu Ala Ala Arg His Val Leu Val Ser Ser Asp Leu Val Cys Lys Ile

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

14/23

788 790 795 800
 Ser Gly Phe Gly Arg Gly Pro Arg Asp Arg Ser Glu Ala Val Tyr Thr
 805 810 815
 Thr Met Ser Gly Arg Ser Pro Ala Leu Trp Ala Ala Pro Glu Thr Leu
 820 825 830
 5 Gln Phe Gly His Phe Ser Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile
 835 840 845
 Ile Met Trp Glu Val Met Ala Phe Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met
 850 855 860
 10 Ser Gly Gln Asp Val Ile Lys Ala Val Glu Asp Gly Phe Arg Leu Pro
 865 870 875 880
 Pro Pro Arg Asn Cys Pro Asn Leu Leu His Arg Leu Met Leu Asp Cys
 885 890 895
 Trp Gln Lys Asp Pro Gly Glu Arg Pro Arg Phe Ser Gln Ile His Ser
 900 905 910
 15 Ile Leu Ser Lys Met Val Gln Asp Pro Glu Pro Pro Lys Cys Ala Leu
 915 920 925
 Thr Thr Cys Pro Arg Pro Pro Thr Pro Leu Ala Asp Arg Ala Phe Ser
 930 935 940
 20 Thr Phe Pro Ser Phe Gly Ser Val Gly Ala Trp Leu Glu Ala Leu Asp
 945 950 955 960
 Leu Cys Arg Tyr Lys Asp Ser Phe Ala Ala Ala Gly Tyr Gly Ser
 965 970 975
 Glu Ala Val Ala Glu Met Thr Ala Gln Asp Leu Val Ser Leu Gly Ile
 980 985 990
 25 Ser Leu Ala Gly His Arg Glu Ala Leu Leu Ser Gly Ile Ser Ala Leu
 995 1000 1005
 Gln Ala Arg Val Leu Gln Leu Gln Gly Gln Val Gln Val
 1010 1015 1020
 30

<210> 5
 <211> 1988
 35 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 40 <222> (1..1944)
 <223> Truncated kinase
 <400> 5
 atc ctc ctc gat tcc aaa gcc tcc cag gcc gag ctg ggc tgg act gca 48
 45 Ile Leu Leu Asp Ser Lys Ala Ser Gln Ala Glu Leu Gly Trp Thr Ala
 1 5 10 15
 ctg cca agt aat ggg tgg gag gag atc agc gcc gtg gat gaa cac gac 96
 50 Leu Pro Ser Asn Gly Trp Glu Glu Ile Ser Gly Val Asp Glu His Asp
 20 25 30
 cgt ccc atc cgc ccg tac caa gtg tgc aat gtg ctg gag ccc aac cag 144
 55 Arg Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Leu Glu Pro Asn Gln
 35 40 45
 gcc aac tgg ctg cag act gcc tgg ata agc cgt ggc cgc ggg cag cgc 192
 60 Asp Asn Trp Leu Gln Thr Gly Trp Ile Ser Arg Gly Arg Gly Gln Arg
 50 55 60
 atc ttc gtg gaa ctg cag ttc aca ctc cgt gac tgc agc agc atc cct 240
 60 Ile Phe Val Glu Leu Gln Phe Thr Leu Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro

WO 02/08253

PC/T/EP01/08210

15/23

	65		70		75		80	
	ggc gcc gcg ggt acc tgc aag gag acc ttc aac gtc tac tac ctg gaa	288						
5	Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu							
		85		90		95		
	act gag gcc gac ctg gcc cgt ggg cgt ccc cgc cta gcc gcc acc cgg	338						
	Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg							
		100		105		110		
10	ccc cgc aaa atc gac acg atc gcc gcc gac gag acc ttc acg cag gcc	384						
	Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Gly							
		115		120		125		
15	gac ctg ggt gag cgc aag atg aag ctg aac aca gag gtg cgc gag atc	432						
	Ala Thr Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Glu Val Arg Glu Ile							
		130		135		140		
20	gga ccg ctc agc cgg cgg ggt ttc cac ctg gcc ttt cag gac gtg gcc	480						
	Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly							
		145		150		155		
25	gca tgc gtg gcc ctt gtc tgg gtg cgc gtc tac tac aag cag tgc cgc	528						
	Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Gln Cys Arg							
		165		170		175		
	gcc acc gtg cgg gcc ctg gcc aag ttc cca gcc acc gca gcc gag agc	576						
	Ala Thr Val Arg Gly Ile Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser							
		180		185		190		
30	gcc ttc tac aca ctg gtg gaa gtg gcc gga acc tgc ctg gcc cac tgg	624						
	Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser							
		195		200		205		
35	gaa ggg gag cct gcc agc ccc cca cgc atg cac tgc gcc gcc gcc gcc	672						
	Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly							
		210		215		220		
40	gag tgg ctg gtc cct gtg gcc cgc tgc agc tgc agc ccc gga ttc cag	720						
	Glu Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln							
		225		230		235		
45	gca cgt ggt gac ttc tgc gaa gcc tgt ccc cca ggg ttt tac aag gtg	768						
	Glu Arg Gly Asp Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val							
		245		250		255		
50	ccc ccg cgg ccc ctc tgc tca cag tgc cca gag cac agc cgg gcc	816						
	Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala							
		260		265		270		
55	ctg gaa aac gcc tcc acc ttc tgc gtg tgc cag gac agc tat gcc cgc	864						
	Leu Glu Asn Ala Ser Thr Phe Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg							
		275		280		285		
60	tca ccc acc gac cgg ccc tgg gct tcc tgc acg cgg ccc ccc tgg gcc	912						
	Ser Pro Thr Asp Pro Pro Ser Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala							
		290		295		300		
65	ccg cgg gac ctg cag tac agc ctg agc cgc tgg ccg ctg gtg ctg cga	960						
	Pro Arg Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg							
		305		310		315		
						320		

WO 02/08253

PC/T/EP01/08210

16/23

1008 ctg cgc tgg ctg ccg ccg gcc gac tgg gga gcc cgc tgg gac gtc acc
 Leu Arg Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr
 325 330 335

5 1056 tac tgg ctg ctg tgc ctg cgc tgc gcc cgc gag gcc ccg gcc gcc gcc
 Tyr Ser Leu Leu Cys Leu Arg Cys Gly Arg Glu Gly Pro Ala Gly Ala
 340 345 350

10 1104 tgc gag ccg tgc ggg ccg cgc gtc gcc ttc cta cgc cgc gca ggg
 Cys Glu Pro Cys Gly Pro Arg Val Ala Phe Leu Pro Arg Gln Ala Gly
 355 360 365

15 1152 ctg ccg gag cga gcc gcc aag ctg ctg cac ctg ccg ccg gcc ggc cgc
 Leu Arg Glu Arg Ala Ala Thr Leu Leu His Leu Arg Pro Gly Ala Arg
 370 375 380

20 1200 tac acc gtc cgc gtc gcc ggc ctc aac gcc gtc tgg gcc ccg gcc gcc
 Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Leu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ala Ala
 385 390 395 400

25 1248 gcc gcc gga acc acc tac gcc cag gtc acc gtc tcc acc ggc ccg ggc
 Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Pro Gly
 405 410 415

30 1296 ggc ccg tgg gag gag gat gag atc cgc agg gac cga gtc gaa ccg cag
 Ala Pro Trp Glu Glu Asp Glu Ile Arg Arg Asp Arg Val Glu Pro Gln
 420 425 430

35 1344 agc gtc tcc ctg tgg tgg ccg gag ccg ctc ccg gcc gga gcc cct ggc
 Ser Val Ser Leu Ser Trp Arg Glu Pro Ile Pro Ala Gly Ala Pro Gly
 435 440 445

40 1392 gcc aat gac acg gag tac gag atc cga tac tac gag aag ggt cag agt
 Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Arg Tyr Tyr Glu Lys Gly Gln Ser
 450 455 460

45 1440 gag ccg act tac tcc atg gtc aag aca ggg gcc ccg aca gtc acc gtc
 Glu Gln Thr Tyr Ser Met Val Lys Thr Gly Ala Pro Thr Val Thr Val
 465 470 475 480

50 1488 acc aac ctg aag ccg gct acc cgc tac gtc ttt cag atc cgg gcc gct
 Thr Asn Leu Lys Pro Ala Thr Arg Tyr Val Phe Gln Ile Arg Ala Ala
 495 495 495

55 1536 tcc ccg ggg cca tcc tgg gag gcc cag act ttt aac ccg agc act gaa
 Ser Pro Gly Pro Ser Trp Glu Ala Gln Ser Phe Asn Pro Ser Ile Glu
 500 505 510

60 1584 gta cag acc ctg ggg gag gct gcc tca ggg tcc agc gac cag agc ccg
 Val Gln Thr Leu Gly Glu Ala Ala Ser Gly Ser Arg Asp Gln Ser Pro
 515 520 525

1632 gcc att gtc gtc acc gta gtc acc atc tgg gcc ctc ctc gtc ctg gcc
 Ala Ile Val Val Thr Val Val Thr Ile Ser Ala Leu Leu Val Leu Gly
 530 535 540

1680 tcc gtc arg agt gty ctg gcc att tgg ccg agc ccg tgc agc tat gcc
 Ser Val Met Ser Val Leu Ala Ile Trp Arg Arg Pro Cys Ser Tyr Gly
 545 550 555 560

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

17/23

```

aaa gga gga ggg gat gcc cct gat gaa gag gag ctg tat ttc cac ttc 1720
Lys Gly Gly Gly Asp Ala His Asp Glu Glu Glu Leu Tyr Phe His Phe
565 570 575
5 aaa gtc cca aca cgt cgc aca ttc ctg gac ccc cag agc tgt ggg gac 1776
Lys Val Pro Thr Arg Arg Thr Phe Leu Asp Pro Gln Ser Cys Gly Asp
580 585 590
10 ctg ctg cag gct gtg cat ctg ttc gcc aag gaa ctg gat ggg aaa agc 1824
Leu Leu Gln Ala Val His Leu Phe Ala Lys Glu Leu Asp Ala Lys Ser
595 600 605
15 gtc acg ctg cag agg agc ctt gga gga ggc aag ctg ggc gcc cag gaa 1872
Val Thr Leu Glu Arg Ser Leu Gly Gly Gly Lys Leu Gly Ala Gln Glu
610 615 620
20 gcc ttg tcc cca tct gga agc ctc acc cac tct ata ggc ccc gcc cct 1920
Ala Leu Ser Pro Ser Gly Ser Leu Thr His Ser Ile Gly Pro Ala Pro
625 630 635 640
25 act ctg tcc aca cct cta tcc tga agcccacctc ccccagggtc tctg 1968
Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser
645
25 <210> 6
<211> 647
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 6
Ile Leu Leu Asp Ser Lys Ala Ser Gln Ala Glu Leu Gly Trp Thr Ala
1 5 10 15
Leu Pro Ser Asn Gly Trp Glu Glu Ile Ser Gly Val Asp Glu His Asp
20 25 30
35 Arg Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Leu Glu Pro Asn Gln
35 40 45
Asp Asn Trp Leu Gln Thr Gly Trp Ile Ser Arg Gly Arg Gly Gln Arg
50 55 60
40 Ile Phe Val Glu Leu Gln Phe Thr Leu Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro
55 60 65
Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu
65 70 75 80
Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg
85 90 95 100
45 Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Gly
105 110 115
Asp Ile Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Glu Val Arg Glu Ile
120 125 130 135
50 Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly
140 145 150 155
Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Gln Cys Arg
160 165 170 175
Ala Thr Val Arg Gly Leu Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser
180 185 190 195
55 Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser
200 205 210
Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly
215 220 225
60 Glu Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln
230 235 240

```

WO 02/08253

PC/EP01/08210

18/23

Glu Arg Gly Asp Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val
 245 250 255
 Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala
 260 265 270
 5 Leu Glu Asp Ala Ser Thr Phe Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg
 275 280 285
 Ser Pro Thr Asp Pro Pro Ser Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala
 290 295 300
 10 Pro Arg Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg
 305 310 315
 Leu Arg Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr
 320 325 330
 Tyr Ser Leu Leu Cys Leu Arg Cys Gly Arg Glu Gly Pro Ala Gly Ala
 340 345 350
 15 Cys Glu Pro Cys Gly Pro Arg Val Ala Phe Leu Pro Arg Gln Ala Gly
 355 360 365
 Leu Arg Glu Arg Ala Ala Thr Leu Leu His Leu Arg Pro Gly Ala Arg
 370 375 380
 20 Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Leu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ala Ala
 385 390 395
 Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Pro Gly
 400 405 410
 Ala Pro Trp Glu Glu Asp Glu Ile Arg Arg Asp Arg Val Glu Pro Gln
 420 425 430
 25 Ser Val Ser Leu Ser Trp Arg Glu Pro Ile Pro Ala Gly Ala Pro Gly
 435 440 445
 Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Arg Tyr Tyr Glu Lys Gly Gln Ser
 450 455 460
 30 Glu Gln Thr Tyr Ser Met Val Lys Thr Gly Ala Pro Thr Val Thr Val
 465 470 475
 Thr Asn Leu Lys Pro Ala Thr Arg Tyr Val Phe Gln Ile Arg Ala Ala
 480 485 490
 Ser Pro Gly Pro Ser Trp Glu Ala Gln Ser Phe Asn Pro Ser Ile Glu
 500 505 510
 35 Val Gln Thr Leu Gly Glu Ala Ala Ser Gly Ser Arg Asp Gln Ser Pro
 515 520 525
 Ala Ile Val Val Thr Val Val Thr Ile Ser Ala Leu Leu Val Leu Gly
 530 535 540
 Ser Val Met Ser Val Leu Ala Ile Trp Arg Arg Pro Cys Ser Tyr Gly
 545 550 555
 40 Lys Gly Gly Gly Asp Ala His Asp Glu Glu Glu Leu Tyr Phe His Phe
 560 565 570
 Lys Val Pro Thr Arg Arg Thr Phe Leu Asp Pro Gln Ser Cys Gly Asp
 580 585 590
 45 Leu Leu Gln Ala Val His Leu Phe Ala Lys Glu Leu Asp Ala Lys Ser
 595 600 605
 Val Thr Leu Glu Arg Ser Leu Gly Gly Gly Lys Leu Gly Ala Gln Glu
 610 615 620
 50 Ala Leu Ser Pro Ser Gly Ser Leu Thr His Ser Ile Gly Pro Ala Pro
 625 630 635
 Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser
 640 645

55 <210> 7
 <211> 2112
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 60 <220>

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

19/23

<221> CDS

<222> (1)..(2088)

<223> Extended truncated kinase

```

5 <400> 7
  atc ctc ctg gat tcc aaa gcc tcc cag gcc gag ctg ggc tgg act gca 48
  Ile Leu Leu Asp Ser Lys Ala Ser Glu Ala Glu Leu Gly Trp Thr Ala
  1 5 10 15
10 ctg cca agt aat ggg tgg gag gag atc agc gcc ctg gat gaa cac gac 96
  Leu Pro Ser Asn Gly Trp Glu Glu Ile Ser Gly Val Asp Glu His Asp
  20
15 cgt ccc atc cgc acg tac cca gtc tgc aat gtc ctg gag ccc aac cag 144
  Arg Pro Ile Arg Thr Tyr Glu Val Cys Asn Val Leu Glu Pro Asn Glu
  35 40 45
20 gac aac tgg ctg cag act gcc tgg ata agc cgt gcc cgc ggc cag cgc 192
  Asp Asn Trp Leu Glu Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Arg
  50 55 60
25 atc ttc ctg gaa ctg cag ttc aca ctc cgt gac tgc agc agc atc cct 240
  Ile Phe Val Glu Leu Glu Phe Thr Leu Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro
  65 70 75 80
30 gcc gcc gcc ggt acc tgc aag gag acc ttc aac gtc tac tac ctg gaa 288
  Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu
  85 90 95
35 act cag gcc cac ctg gcc cgt gag cgt ccc cgc ota gcc gcc agc egg 336
  Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg
  100 105 110
40 ccc cgc aaa atc gcc acg atc gcc gcc gcc gag agc ttc acg cag gcc 384
  Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Glu Gly
  115 120 125
45 gac ctg ggt gag cgc aag atg aag ctg aac aca gag ctg cgc cag atc 432
  Asp Leu Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Glu Val Arg Glu Ile
  130 135 140
50 gga ccg ctc agc cgg cgg cgt ttc cac ctg gcc ttt cag gac gtc gcc 480
  Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Glu Asp Val Gly
  145 150 155 160
55 gca tgc gtc gcc ctt gtc tcc gtc gcc gtc tac tac aag cag tgc cgc 528
  Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Glu Cys Arg
  165 170 175
60 gcc acc gtc cgg gcc ctg gcc acc ttc cca gcc acc gca gcc cag agc 576
  Ala Thr Val Arg Gly Leu Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser
  180 185 190
65 gcc ttc tcc aca ctg gtc gaa gtc gcc gga acg tgc gtc gcc cac tcg 624
  Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser
  195 200 205
70 gaa ggg gag cct gcc agc ccc cca cgc atg cac tgc gcc gcc gac gcc 672
  Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly
  210 215 220

```

WO 02/08253

PC/T/EP01/08210

20/23

	gag tgg ctg gtg cct gtg ggc cgc tgc agc tgc agc ggc gga ttc cag	720
	Glu Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln	
	225 230 235 240	
5	jag cgt ggt gac ttc tgc gaa gcc tgt ccc cca ggg tit tac aag gtg	768
	Ser Pro Arg Arg Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val	
	245 250 255	
10	tcc ccg cgg cgg ccc ctc tgc tca ccg tgc cca gag cac agc cgg gcc	816
	Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala	
	260 265 270	
15	ctg gaa aac gcc tcc acc ttc tgc gtg tgc cag gac agc tat gcg cgc	864
	Leu Glu Asn Ala Ser Thr Phe Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg	
	275 280 285	
20	toa ccc acc gac ccg ccc tcg gct tcc tgc acc ccg ccg ccg tcg ccg	912
	Pro Pro Thr Asp Pro Pro Ser Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala	
	290 295 300	
25	ccg cgg gac ctg cag tcc agc ctg agc cgc tcg ccg ctg gtg ctg cga	960
	Pro Arg Asp Leu Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg	
	305 310 315 320	
30	ctg cgc tgg ctg ccg ccg gcc gac tcg gga gcc cgc tcg gac gtc acc	1008
	Tyr Ser Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr	
	325 330 335	
35	tac tcg ctg tgc ctg cgc tgc ggc cgc gag ggc ccg ccg cgc gcc	1056
	Tyr Ser Ileu Leu Cys Leu Arg Cys Gly Arg Glu Gly Pro Ala Gly Ala	
	340 345 350	
40	tgc gag ccg tgc ggg ccg cgt gtg gcc ttc cta ccg cgc cac gca ggg	1104
	Cys Glu Pro Cys Gly Pro Arg Val Ala Phe Leu Pro Arg Gln Ala Gly	
	355 360 365	
45	ctg cgg gag cga gcc gcc acc ctg ctg cac ctg cgg ccc ggc ccg cgc	1152
	Leu Arg Glu Arg Ala Ala Thr Leu Leu His Leu Arg Pro Gly Ala Arg	
	370 375 380	
50	tac acc gtc cgc gtc gcc cgc ctc aac ggc gtr tcg ggc ccg ccg gcc	1200
	Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Leu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ala Ala	
	385 390 395 400	
55	gcc ccg gga acc acc tac gcg cag gtc acc gtc tcc acc ggg ccc ggg	1248
	Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Pro Gly	
	405 410 415	
60	gca ccc tgg gag gag gat gag atc cgc agg gac cga gtg gaa ccc cag	1296
	Ala Pro Trp Glu Glu Asp Glu Ile Arg Arg Asp Arg Val Glu Pro Gln	
	420 425 430	
65	agc gtc tcc ctg tcg tgg cgg gag ccc atc cct gcc gga gcc cct ggg	1344
	Ser Val Ser Leu Ser Trp Arg Glu Pro Ile Pro Ala Gly Ala Pro Gly	
	435 440 445	
70	gcc aat gac agc gag tac gag atc cga tac taa gag aag ggt cag agt	1392
	Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Arg Tyr Tyr Glu Lys Gly Gln Ser	
	450 455 460	
75	gag cag act tac tcc atg gtg aag aca ggg gcg ccc aca gtc acc gtc	1440

WO 02/08253

PCT/EP01/08210

22/23

<211> 695
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> S
 Ile Leu Leu Asp Ser Lys Ala Ser Gln Ala Glu Leu Gly Trp Thr Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Ser Asn Gly Trp Glu Glu Ile Ser Gly Val Asp Glu His Asp
 20 25 30
 10 Arg Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Leu Glu Pro Asn Gln
 35 40 45
 Asp Asn Trp Leu Gln Thr Gly Trp Ile Ser Arg Gly Arg Gly Gln Arg
 50 55 60
 Ile Phe Val Glu Leu Gln Phe Thr Leu Arg Asp Cys Ser Ser Ile Pro
 65 70 75 80
 Gly Ala Ala Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Val Tyr Tyr Leu Glu
 85 90 95
 Thr Glu Ala Asp Leu Gly Arg Gly Arg Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg
 100 105 110
 20 Pro Arg Lys Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Gly
 115 120 125
 Asp Leu Gly Glu Arg Lys Met Lys Leu Asn Thr Glu Val Arg Glu Ile
 130 135 140
 Gly Pro Leu Ser Arg Arg Gly Phe His Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly
 145 150 155 160
 25 Ala Cys Val Ala Leu Val Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Gln Cys Arg
 165 170 175
 Ala Thr Val Arg Gly Leu Ala Thr Phe Pro Ala Thr Ala Ala Glu Ser
 180 185 190
 30 Ala Phe Ser Thr Leu Val Glu Val Ala Gly Thr Cys Val Ala His Ser
 195 200 205
 Glu Gly Glu Pro Gly Ser Pro Pro Arg Met His Cys Gly Ala Asp Gly
 210 215 220
 Glu Trp Leu Val Pro Val Gly Arg Cys Ser Cys Ser Ala Gly Phe Gln
 225 230 235 240
 35 Glu Arg Gly Asp Phe Cys Glu Ala Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Lys Val
 245 250 255
 Ser Pro Arg Arg Pro Leu Cys Ser Pro Cys Pro Glu His Ser Arg Ala
 260 265 270
 40 Leu Glu Asn Ala Ser Thr Phe Cys Val Cys Gln Asp Ser Tyr Ala Arg
 275 280 285
 Ser Pro Thr Asp Pro Pro Ser Ala Ser Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala
 290 295 300
 Pro Arg Asp Leu Gln Tyr Ser Leu Ser Arg Ser Pro Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320
 45 Leu Arg Trp Leu Pro Pro Ala Asp Ser Gly Gly Arg Ser Asp Val Thr
 325 330 335
 Tyr Ser Leu Leu Cys Leu Arg Cys Gly Arg Glu Gly Pro Ala Gly Ala
 340 345 350
 50 Cys Glu Pro Cys Gly Pro Arg Val Ala Phe Leu Pro Arg Gln Ala Gly
 355 360 365
 Leu Arg Glu Arg Ala Ala Thr Leu Leu His Leu Arg Pro Gly Ala Arg
 370 375 380
 Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Leu Asn Gly Val Ser Gly Pro Ala Ala
 385 390 395 400
 55 Ala Ala Gly Thr Thr Tyr Ala Gln Val Thr Val Ser Thr Gly Pro Gly
 405 410 415
 Ala Pro Trp Glu Glu Asp Glu Ile Arg Arg Asp Arg Val Glu Pro Gln
 420 425 430
 60 Ser Val Ser Leu Ser Trp Arg Glu Pro Ile Pro Ala Gly Ala Pro Gly
 435 440 445

WO 02/08253

PC/EP01/08210

23/23

Ala Asn Asp Thr Glu Tyr Glu Ile Arg Tyr Tyr Glu Lys Gly Gln Ser
450 455 460
Glu Gln Thr Tyr Ser Met Val Lys Thr Gly Ala Pro Thr Val Thr Val
465 470 475 480
5 Thr Asn Leu Lys Pro Ala Thr Arg Tyr Val Phe Gln Ile Arg Ala Ala
485 490 495
Ser Pro Gly Pro Ser Trp Glu Ala Gln Ser Phe Asn Pro Ser Ile Glu
500 505 510
10 Val Gln Thr Leu Gly Glu Ala Ala Ser Gly Ser Arg Asp Gln Ser Pro
515 520 525
Ala Ile Val Val Thr Val Val Thr Ile Ser Ala Leu Leu Val Leu Gly
530 535 540
Ser Val Met Ser Val Leu Ala Ile Trp Arg Arg Pro Cys Ser Tyr Gly
545 550 555 560
15 Lys Gly Gly Gly Asp Ala His Asp Glu Glu Leu Tyr Phe His Cys
565 570 575
Glu Leu Ala Gly Pro Gly Trp Gly Gly Ala Gly Ser Thr Leu Pro His
580 585 590
20 Ser Ser Ala Leu Cys Leu Ala Thr Leu His Glu Pro Ala Cys Gln Pro
595 600 605
Gln Trp Trp Arg Pro His Ser Ser Gly Ser Ser Leu Ser Leu Pro Val
610 615 620
Lys Val Pro Thr Arg Arg Thr Phe Leu Asp Pro Gln Ser Cys Gly Asp
625 630 635 640
25 Leu Leu Gln Ala Val His Leu Phe Ala Lys Glu Leu Asp Ala Lys Ser
645 650 655
Val Thr Leu Glu Arg Ser Leu Gly Gly Gly Lys Leu Gly Ala Gln Glu
660 665 670
Ala Leu Ser Pro Ser Gly Ser Leu Thr His Ser Ile Gly Pro Ala Pro
675 680 685
30 Thr Leu Ser Thr Pro Leu Ser
690 695

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
31 January 2002 (31.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/08253 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/705
 (21) International Application Number: PCT/EP01/08210
 (22) International Filing Date: 17 July 2001 (17.07.2001)
 (25) Filing Language: English
 (26) Publication Language: English
 (30) Priority Data: 09116844.9 26 July 2000 (26.07.2000) EP
 (71) Applicant (for all designated States except US): MERCK PATENT GMBH (DE/DE); Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
 (72) Inventors; and
 (75) Inventors/Applicants (for US only): HÜCK, Björn (DE/DE); Nordstrasse 2a, 62477 Mainz (DE); DÜCKER, Klaus (DE/DE); Esteterstrasse 5, D-64291 Darmstadt (DE).
 (74) Common Representative: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CU, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RP, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NI, SN, TD, TG).
- Published:
 with international search report
 -- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 2 May 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/08253 A3

(54) Title: A NOVEL MEMBER OF THE EphA RECEPTOR FAMILY

(57) Abstract: EphA9 polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing EphA9 polypeptides and polynucleotides in diagnostic assays.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/08210															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>FOX, G.M. ET AL: "cDNA cloning and tissue distribution of five human Eph-like receptor protein-tyrosine kinases" ONCOGENE, no. 10, 1995, pages 897-905, XP000946743 cited in the application the whole document</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>GALE, N.W. ET AL: "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis" NEURON, vol. 17, July 1996 (1996-07), pages 9-19, XP002048874 cited in the application the whole document</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">---</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">-/-</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	FOX, G.M. ET AL: "cDNA cloning and tissue distribution of five human Eph-like receptor protein-tyrosine kinases" ONCOGENE, no. 10, 1995, pages 897-905, XP000946743 cited in the application the whole document	1-11	Y	GALE, N.W. ET AL: "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis" NEURON, vol. 17, July 1996 (1996-07), pages 9-19, XP002048874 cited in the application the whole document	1-11		---			-/-	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	FOX, G.M. ET AL: "cDNA cloning and tissue distribution of five human Eph-like receptor protein-tyrosine kinases" ONCOGENE, no. 10, 1995, pages 897-905, XP000946743 cited in the application the whole document	1-11															
Y	GALE, N.W. ET AL: "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis" NEURON, vol. 17, July 1996 (1996-07), pages 9-19, XP002048874 cited in the application the whole document	1-11															

	-/-																
<input checked="" type="checkbox"/> 1 entries documents are listed in the continuation of box C.																	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex																	
Special categories of cited documents *a* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *b* earlier document(s) published on or after the international filing date *c* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *d* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *e* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
f late document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle of theory underlying the invention *g* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *h* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *i* document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report																
28 January 2002	22/02/2002																
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box Palatinat 2 NL - 2000 LW Hilversum Tel. (+31-174) 349-2040 Ex. 31 651 ext. 01 Fax (+31-174) 349-3016	Authorized officer Moreno de Vega, C																

Form PCT/ISA/210 (Revised form) July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/08218

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HOLLAND, S. J ET AL: "Juxtamembrane tyrosine residues couple the Eph family receptor EphB2/Nuk to specific SH2 domain proteins in neuronal cells" THE EMBO JOURNAL, vol. 16, no. 13, 1997, pages 3877-3888, XP002188451 cited in the application the whole document ---	I-11
Y	WO 99 52541 A (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document -----	I-11

1

*Form PCT/ISA/210 (continuation of revised sheet) July 1997

International Application No. PCT/JP 01/08210

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Present claim 11 relates to an extremely large number of possible methods. In fact, the claim contain so many options and variables that a lack of clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear, namely those methods mentioned in the description at page 19, lines 15-30, e.g. ELISA, radioimmunoassay, surface plasmon resonance and spectroscopy.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/08210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9952541	A	21-10-1999	
		AU 3745999 A	01-11-1999
		EP 1133310 A2	19-09-2001
		WO 9952541 A2	21-10-1999
		US 2001024650 A1	27-09-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A

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

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 ホック、 ブェーン

ドイツ連邦共和国 6 3 4 7 7 マイントル ノルドシュトラッセ 2 アー

(72) 発明者 デュエッケル、 クラウス



ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 1 ダルムシュタット エッテステルシュトラッセ 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA04 CA07 CA09 DA01 DA02 DA05
 DA11 EA01 EA02 EA03 EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA03
 HA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25
 QS34 QS36 QX02
 4B064 AG01 AG26 CA01 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
 CA44 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20
 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	EphA受体家族的新成员		
公开(公告)号	JP2004504061A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2002514157	申请日	2001-07-17
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	ホックブエーン デュエツケルクラウス		
发明人	ホック、ブエーン デュエツケル、クラウス		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/00 C07K14/705 C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/715 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	伊藤 克博		
优先权	2000116044 2000-07-26 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了EphA9的多肽和多核苷酸，以及通过重组技术产生这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用EphA9多肽和多核苷酸的方法。

<p>(19) World Intellectual Property Organization International Bureau</p>			
<p>(43) International Publication Date 31 January 2002 (31.01.2002)</p>		<p>PCT</p>	<p>(10) International Publication Number WO 02/08253 A2</p>
(51) International Patent Classification:	C07K 14/00	(81) Designated States (national):	AF, AG, AI, AM, AN, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GN, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LA, LB, LC, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NG, NZ, OL, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(21) International Application Number:	PCT/EP01/08210	(84) Designated States (regional):	ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) International Filing Date:	17 July 2001 (17.07.2001)		
(25) Filing Language:	English		
(26) Publication Language:	English		
(30) Priority Data:	0016944.9 26 July 2000 (26.07.2000) EP		
(71) Applicant (for all designated States except US):	MERCK PATENT GMBH (DE2193), Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).		
(72) Inventors and (75) Inventors/Applicants (for US only):	HOCK, Björn (DE2193), Neefstrasse 2a, 63177 Maintal (DE); DÜCKER, Klaus (DE2193), Ebnestrasse 3, D 64291 Darmstadt (DE).	Published:	without international search report and to be republished upon receipt of that report
(74) Common Representative:	MERCK PATENT GMBH, Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).		For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.