

(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2004-510429

(P2004-510429A)

(43) 公表日 平成16年4月8日(2004.4.8)

(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
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B O 5 0
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/55	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 181 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-532488 (P2002-532488)	(71) 出願人	591063187
(86) (22) 出願日	平成13年10月5日 (2001.10.5)		バイエル アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月7日 (2003.4.7)		ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン (
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011516		番地なし)
(87) 国際公開番号	W02002/028906		D-51368 Leverkusen,
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		Germany
(31) 優先権主張番号	60/238,005	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成12年10月6日 (2000.10.6)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100103230
(31) 優先権主張番号	60/314,113		弁理士 高山 裕貢
(32) 優先日	平成13年8月23日 (2001.8.23)	(74) 代理人	100087114
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 齋藤 みの里
		(72) 発明者	ソフィア・コッシダ
			スイス4056バーゼル、ミットレレ・シ
			ュトラーセ69番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の調節

(57) 【要約】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を調節する試薬およびヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子産物と結合する試薬は、細胞内シグナル伝達、結果として細胞増殖およびアポトーシスを調節するために使用することができる。そのような調節は、癌、喘息、アレルギー（慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患を含むがこれに限られない）、中枢および末梢神経系の障害（例えばパーキンソン病）の処置に特に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列；および配列番号 2 に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列；配列番号 10 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列；および配列番号 10 に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列配列番号 11 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列；および配列番号 11 に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードするポリヌクレオチド；

10

b) 配列番号 1 または 9 に記載の配列を含むポリヌクレオチド；

c) (a) および (b) に明記するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) ~ (c) に明記するポリヌクレオチド配列から逸脱しているポリヌクレオチド；並びに

e) (a) ~ (d) に明記するポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表すポリヌクレオチド、

から成る群より選択されるポリヌクレオチド。

【請求項 2】

20

請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされている、実質上精製されたヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質。

【請求項 5】

a) 請求項 3 に記載の宿主細胞を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の発現に好適な条件下で培養する工程；および、

b) 該宿主細胞培養からヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を回収する工程、を含む、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を産生する方法。

30

【請求項 6】

a) 請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドを生物試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させる細胞工程；および、

b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程、

を含む、生物試料中のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出するための方法。

【請求項 7】

ハイブリダイゼーション前に、生物試料の核酸材料を増幅させる細胞、請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 8】

生物試料を、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と特異的に相互作用する試薬と接触させる細胞工程を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を検出するための方法。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の方法を実施するための診断キット。

【請求項 10】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによってコードされている任意のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と接触させる細胞工程；

50

該ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に対する被験化合物の結合を検出する工程、を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を低下させ細胞物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドと結合する被験化合物を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を低下させ細胞可能性のある治療物質として同定する方法。

【請求項 1 1】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドによってコードされるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と接触させ細胞工程；および、
該ポリペプチドのヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を検出する工程、
を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を増大させ細胞被験化合物をヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を増大させ細胞可能性のある治療物質として同定し、そして該ポリペプチドのヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を減少させ細胞被験化合物をヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少させ細胞可能性のある治療物質として同定する方法。

10

【請求項 1 2】

被験化合物を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドと接触させ、該ポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合を検出する工程を含む、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少させ細胞物質をスクリーニングする方法であって、該ポリヌクレオチドに結合する被験化合物をヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少させ細胞可能性のある治療物質として同定する方法。

20

【請求項 1 3】

細胞を、請求項 1 に記載の任意のポリヌクレオチドまたは請求項 4 に記載の任意のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少させ細胞工程を含む、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少させ細胞方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の方法によって同定される、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはポリヌクレオチドの活性を調節する試薬。

【請求項 1 5】

請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

30

【請求項 1 6】

疾患においてヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を調節する、請求項 2 に記載の発現ベクターまたは請求項 1 4 に記載の試薬の使用。

【請求項 1 7】

該疾患が、癌、喘息、アレルギー、自己免疫疾患あるいは中枢神経系若しくは末梢神経系疾患である、請求項 1 6 に記載の使用。

【請求項 1 8】

配列番号 2、1 0 または 1 1 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする c D N A。

40

【請求項 1 9】

配列番号 1 または 9 を含む、請求項 1 8 に記載の c D N A。

【請求項 2 0】

配列番号 1 または 9 から成る、請求項 1 8 に記載の c D N A。

【請求項 2 1】

配列番号 2、1 0、1 1 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2 2】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1 または 9 から成る、請求項 2 1 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 3】

50

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 24】

該ポリヌクレオチドが配列番号 1 または 9 から成る、請求項 23 に記載の宿主細胞。

【請求項 25】

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含む精製されたポリペプチド。

【請求項 26】

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列から成る、請求項 25 に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項 27】

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 28】

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクターを含む宿主細胞を、該ポリペプチドが発現される条件下で培養し；そして該ポリペプチドを単離する工程を含む、該ポリペプチドを産生する方法。

【請求項 29】

該発現ベクターが配列番号 1 または 9 を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

配列番号 1 または 9 に記載の 11 個の連続ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを、生物試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させ；そして、該ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程を含む、配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出する方法。

【請求項 31】

ハイブリダイズ細胞工程の前に、該核酸材料を増幅細胞工程をさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

配列番号 1 または 9 に記載の 11 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；および、

請求項 30 に記載の方法についての説明書、

を含む、配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドのコード配列を検出するためのキット。

【請求項 33】

生物試料を、配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する試薬と接触させて、試薬 - ポリペプチド複合体を形成させ細胞工程；および、該試薬 - ポリペプチド複合体を検出する工程、

を含む、該ポリペプチドを検出する方法。

【請求項 34】

該試薬が抗体である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体；および

請求項 33 に記載の方法についての説明書、

を含む、該ポリペプチドを検出するためのキット。

【請求項 36】

被験化合物を、(1) 配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列、および(2) 配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列、から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させ細胞工程；および

該ポリペプチドに対する被験化合物の結合を検出する工程、

を含むヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を調節することができる物質

10

20

30

40

50

をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドに結合する被験化合物をヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を調節する可能性のある物質として同定する方法。

【請求項 37】

接触さ細胞工程が細胞においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

細胞がインビトロである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

接触さ細胞工程が無細胞系においてである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

該ポリペプチドが検出可能な標識を含む、請求項 36 に記載の方法。

10

【請求項 41】

被験化合物が検出可能な標識を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

被験化合物が該ポリペプチドと結合している標識化リガンドに取って代わる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 43】

該ポリペプチドが固体支持体と結合している、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 44】

被験化合物が固体支持体と結合している、請求項 36 に記載の方法。

20

【請求項 45】

被験化合物を、(1) 配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列、および、(2) 配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列、から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触さ細胞工程；および該ポリペプチドの活性を検出する工程、
を含むヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、該ポリペプチドの活性を増大さ細胞被験化合物をヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を増大さ細胞可能性のある物質として同定し、該ポリペプチドの活性を減少さ細胞被験化合物をヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少さ細胞可能性のある物質として同定する方法。

30

【請求項 46】

接触さ細胞工程が細胞においてである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

細胞がインビトロである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

接触さ細胞工程が無細胞系においてである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 49】

被験化合物を、配列番号 1 または 9 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と接触さ細胞工程；および該産物に対する被験化合物の結合を検出する工程、
を含むヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を調節する物質をスクリーニングする方法であって、該産物に結合する被験化合物をヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を調節する可能性のある物質として同定する方法。

40

【請求項 50】

該産物がポリペプチドである、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

該産物が RNA である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 52】

細胞を、配列番号 1 または 9 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒトヒトスフィンゴシン

50

キナーゼ様タンパク質の活性を減少させる細胞工程を含む、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少させる細胞方法。

【請求項 53】

該産物がポリペプチドである、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

該産物が抗体である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

該産物が RNA である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 56】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 55 に記載の方法。

10

【請求項 57】

該試薬がリボザイムである、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

細胞がインビトロである、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 59】

細胞がインビボである、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 60】

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する試薬；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 61】

20

該試薬が抗体である、請求項 60 に記載の医薬組成物。

【請求項 62】

配列番号 1 または 9 に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの産物と特異的に結合する試薬；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 63】

該試薬がリボザイムである、請求項 62 に記載の医薬組成物。

【請求項 64】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 62 に記載の医薬組成物。

【請求項 65】

該試薬が抗体である、請求項 62 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 66】

配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現ベクター；および製薬的に許容し得る担体、を含む医薬組成物。

【請求項 67】

該発現ベクターが配列番号 1 または 9 を含む、請求項 66 に記載の医薬組成物。

【請求項 68】

癌、喘息、アレルギー、自己免疫疾患あるいは中枢神経系若しくは末梢神経系疾患より選択されるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質機能障害関連疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の機能を調節する試薬の治療的有効量を投与し、それによりヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質機能障害関連疾患の症状を回復させる細胞工程を含む方法。

40

【請求項 69】

該試薬が請求項 36 に記載の方法によって同定される、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

該試薬が請求項 45 に記載の方法によって同定される、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 71】

該試薬が請求項 49 に記載の方法によって同定される、請求項 68 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

50

本発明は、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の調節に関する。

【0002】

発明の背景

プロテアーゼは、アミノ酸間のペプチド結合を加水分解し、代謝および他の生物学的プロセスにおいて重要な役割を担う。これらは、酵素前駆体を機能的酵素にプロセッシングすることによって酵素活性を調節し、細胞外に酵素を放出し、加水分解によって酵素を活性化する。プロテアーゼの差次的発現またはその他の選択的活性化は疾患状態に関与している。多数のヒト疾患はプロテアーゼ量と関連している。手短かな再考に関しては、米国特許第6,001,814号を参照のこと。例えば、HI.V.タンパク質はポリタンパク質前駆体として翻訳され、これはHI.V.がコードするプロテアーゼによる成熟分子として放出されるまで不活性である。したがって、プロテアーゼおよびプロテアーゼアゴニストおよびアンタゴニストの同定は、医学上重要である。

10

【0003】

プロテアーゼの1クラスはセリンプロテアーゼである。このセリンプロテアーゼクラスは、キモトリプシン、カテプシンG、トリプシンおよびトロンピンを含む種々のプロテアーゼから構成される。セリンプロテアーゼは、セリン-195、ヒスチジン-57およびアスパラギン酸-102（これらはキモトリプシンの番号付け体系に基づく）からなる触媒性の三つ組を特徴とする。LangおよびSchullerは、EMBLデータベースに配列を寄託した。これはEMBL受入れ番号第AF064819号（扁平上皮細胞癌中で異常発現された遺伝子のcDNA配列として記載されている）、DESC1である。DESC1はセリンプロテアーゼである。DESC1は、扁平上皮細胞舌癌または転移性頸部結節組織中ではなく、正常な口頭上皮中に発現される。

20

【0004】

このことは、疾患状態におけるこの遺伝子および同様の遺伝子に関する役割を示唆する。関連する遺伝子の単離およびこれらの遺伝子およびそれぞれの遺伝子産物のアゴニストおよびアンタゴニストの同定に関する必要が存在する。

【0005】

発明の要旨

本発明の課題は、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を調節する試薬および方法を提供することである。本発明のこの課題および他の課題は、以下に記載の1またはそれ以上の態様によって提供される。

30

【0006】

本発明の一態様は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質である：

配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性を有するアミノ酸配列；

配列番号2で示されるアミノ酸配列；

配列番号10に示されるアミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性を有するアミノ酸配列；

配列番号10で示されるアミノ酸配列；

40

配列番号11に示されるアミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性を有するアミノ酸配列；および

配列番号11で示されるアミノ酸配列。

【0007】

本発明のさらに別の態様は、細胞外基質分解を減少さ細胞物質のスクリーニング方法である。試験（被験）化合物を、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と接触さ細胞：

配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性を有するアミノ酸配列；

配列番号2で示されるアミノ酸配列；

50

配列番号 10 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 50% の同一性を有するアミノ酸配列；

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列；

配列番号 11 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 50% の同一性を有するアミノ酸配列；および

配列番号 11 で示されるアミノ酸配列

【0008】

試験化合物およびヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質間の結合を検出する。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と結合する試験化合物は、これにより、細胞外基質分解を減少さ細胞のに有望な物質として同定される。この物質はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を減少さ細胞ことによって機能し得る。

10

【0009】

本発明の別の態様は、細胞外基質分解を減少さ細胞物質のスクリーニング方法である。試験化合物を、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードするポリヌクレオチドと接触さ細胞；

配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 50% の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列；

配列番号 9 で示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 50% の同一性を有するヌクレオチド配列；

20

配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列。

【0010】

このポリヌクレオチドに対する試験化合物の結合を検出する。このポリヌクレオチドと結合する試験化合物は、細胞外基質分解を減少さ細胞のに有望な物質として同定される。この物質はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質 mRNA と相互作用することを介し、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の量を減少さ細胞ことによって機能し得る。

【0011】

本発明の別の態様は、細胞外基質分解を調節する物質をスクリーニングする方法である。試験化合物を、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と接触さ細胞；

30

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 50% の同一性を有するアミノ酸配列；

配列番号 2 で示されるアミノ酸配列；

配列番号 10 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 50% の同一性を有するアミノ酸配列；

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列；

配列番号 11 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 50% の同一性を有するアミノ酸配列；および

配列番号 11 で示されるアミノ酸配列。

【0012】

ポリペプチドのヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を検出する。このポリペプチドのヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を、試験化合物の不存在下におけるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性と比較して増大さ細胞試験化合物は、これにより、細胞外基質分解の増大に関して有望な物質として同定される。このポリペプチドのヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を、試験化合物の不存在下におけるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性と比較して減少さ細胞試験化合物は、これにより、細胞外基質分解の減少に関して有望な物質として同定される。

40

【0013】

本発明のさらに別の態様は、細胞外基質分解を減少さ細胞物質のスクリーニング方法である。試験化合物を、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオ

50

チドのヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質産物と接触さ細胞：

配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 50% の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列；

配列番号 9 で示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 50% の同一性を有するヌクレオチド配列；

配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列。

【0014】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質産物に対する試験化合物の結合を検出する。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質産物と結合する試験化合物は、これにより、細胞外基質分解の減少に関して有望な物質として同定される。

10

【0015】

本発明のさらに別の態様は、細胞外基質分解を減少さ細胞方法である。細胞を、以下からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはこのポリヌクレオチドによってコードされる産物と特異的に結合する試薬と接触さ細胞：

配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 50% の同一性を有するヌクレオチド配列；ならびに、

配列番号 1 で示されるヌクレオチド配列；

配列番号 9 で示されるヌクレオチド配列と少なくとも約 50% の同一性を有するヌクレオチド配列；

20

配列番号 9 に示されるヌクレオチド配列。

【0016】

細胞内のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性はこれにより減少する。したがって本発明は、例えばこの酵素の活性部位におけるアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る試験化合物を同定するのに使用可能なヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を提供する。ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質およびその断片はまた、この酵素をブロックし、効率的にその活性を減少さ細胞ことができる特異的抗体を生じさ細胞のに有用である。

30

【0017】

本発明の詳しい説明

本発明は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、

a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列；および配列番号 2 に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列；配列番号 10 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列；および配列番号 10 に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列配列番号 11 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 50% 一致するアミノ酸配列；および配列番号 11 に示すアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含むヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードするポリヌクレオチド；

40

b) 配列番号 1 または 9 に記載の配列を含むポリヌクレオチド；

c) (a) および (b) に明記するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

d) 遺伝コードの縮重のため、その配列が (a) ~ (c) に明記するポリヌクレオチド配列から逸脱しているポリヌクレオチド；並びに

e) (a) ~ (d) に明記するポリヌクレオチド配列の断片、誘導体またはアレル変異体を表すポリヌクレオチド、

から成る群より選択されるポリヌクレオチドに関する。

【0018】

50

さらに、新規ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、特にヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質が本発明の発見であることが本出願人により発見された。ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、EMBL受入れ番号第AF244547号(配列番号3)を用いて同定され、セリンプロテアーゼDESC1(図12)と注釈されるタンパク質と232アミノ酸にわたって28%の同一性を有する。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質はジアシルグリセロールキナーゼドメインを含有し、これは図13において太字で示される。

【0019】

配列番号2をコードする配列は、配列番号1に示される。配列番号10および11をコードする配列は、配列番号9に示される。関連EST(配列番号4~8)は、Bリンパ球、Tリンパ球、胚組織、肝臓、卵巣、脳および腎臓において発現される。

10

【0020】

本発明のヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、癌、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、心血管および末梢神経系または中枢神経系疾患の処置および診断に有用であることが予想される(Liu, et al., J Biol. Chem. 275, 19513-20, 2000)参照)。また、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質および遺伝子は、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質および遺伝子アゴニストおよびアンタゴニストをスクリーニングするのに用いることもできる。

【0021】

ポリペプチド

本発明に係るヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質には、配列番号2に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも6、10、15、25、50、75、100、125、150、175、200、225、275、300、320または326個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の一部、完全長のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、又はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。本発明に係るヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質には、配列番号10に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも6、10、15、25、50、75、100、125、150、175、200、225、275、300、320、325、350、375、400、425、450、475、500、525または537個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の一部、完全長のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、又はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。本発明に係るヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質には、配列番号11に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも6、10、15、25、50、75、100、125、150、175、200、225、275、300、320、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550または562個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の一部、完全長のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、又はヒトスフィンゴシンepitope-binding fragments thereof), and small organic or inorganic molecules. キナーゼ様タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。

20

30

40

【0022】

生物学的に活性な変異体

生物学的活性がある、即ちセリンプロテアーゼ、および、好ましくはトリプシンセリンプロテアーゼ活性を保持しているヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質変異体もまた、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質である。天然または非天然ヒトスフィンゴシン

50

キナーゼ様タンパク質変異体は、配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列と少なくとも約 30、35、40、45、50、55、60、65、70%、好ましくは、約 75、90、96、98% 一致するアミノ酸配列またはその断片を有することが好ましい。推定されるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質変異体と配列番号 2 に記載のアミノ酸配列との間の一致（同一性）パーセントは、Blast2 整列（アライメント）プログラムを用いて決定される。

【0023】

一致パーセントの変異は、例えばアミノ酸置換、挿入または欠失に起因し得る。アミノ酸置換は 1 対 1 のアミノ酸の置き換えとして定義される。置換されたアミノ酸が類似の構造のおよび/または化学的性質を有する場合、置換は事実上保存的である。保存的置換の例は、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの置換、グルタメートによるアスパルテートの置換、またはセリンによるスレオニンの置換である。

10

【0024】

アミノ酸挿入または欠失はアミノ酸配列への、またはその内部での変化である。これらは典型的には約 1 ~ 5 アミノ酸の範囲で起こる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の生物学的または免疫学的活性を破壊することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失できるかを決定する際の指針は、当分野で周知のコンピュータプログラム、例えば DNASTAR ソフトウェアを用いて見出すことができる。あるアミノ酸変化が生物学的に活性なヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に影響するか否かは、例えば Liu, et al., J. Biol. Chem. 275, 19513 - 19520, 2000 に記載のように、セリンプロテアーゼ活性を検定することにより容易に決定できる。

20

【0025】

融合タンパク質

融合タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質アミノ酸配列に対する抗体の作製に、そして様々な検定系での使用に有用である。例えば、融合タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の一部と相互作用するタンパク質の同定に使用できる。タンパク質親和クロマトグラフィーまたはタンパク質相互作用のためのライブラリーに基づく検定、例えば酵母 2 - ハイブリッドまたはファージディスプレイ系をこの目的のために使用できる。このような方法は当分野で周知であり、薬物スクリーニングとしても使用できる。

30

【0026】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質融合タンパク質は、ペプチド結合により互いに融合した二つのポリペプチドセグメントを含んでいる。第一のポリペプチドセグメントは、配列番号 2 または上記のような生物学的に活性な変異体の少なくとも 6、10、15、25、50、75、100、125、150、175、200、225、275、300、320 または 326 個の連続アミノ酸を含む。第一のポリペプチドセグメントはまた、完全長ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を含み得る。本発明に係るヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質には、配列番号 10 に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも 6、10、15、25、50、75、100、125、150、175、200、225、275、300、320、325、350、375、400、425、450、475、500、525 または 537 個の連続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の一部、完全長のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、又はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。本発明に係るヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質には、配列番号 11 に示すアミノ酸配列、または以下定義による生物学的に活性なその変異体より選択される、少なくとも 6、10、15、25、50、75、100、125、150、175、200、225、275、300、320、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550 または 562 個の連

40

50

続アミノ酸が含まれる。したがって、本発明のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の一部、完全長のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、又はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の全部または一部を含む融合タンパク質であり得る。

【0027】

第二のポリペプチドセグメントは完全長タンパク質またはタンパク質断片であってよい。融合タンパク質の構築に一般的に使用するタンパク質は、
- ガラクトシダーゼ、
- グルクロニダーゼ、
- 緑色蛍光タンパク質 (GFP)、
- 自己蛍光タンパク質 (青色蛍光タンパク質 (BFP) を包含する)、
- グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、
- ルシフェラーゼ、
- 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、
- およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を包含する。さらに、融合タンパク質の構築には、ヒスチジン (His) 標識、FLAG 標識、インフルエンザヘマグルチニン (HA) 標識、Myc 標識、VSV-G 標識、およびチオレドキシニン (Trx) 標識を包含するエピトープ標識を使用する。その他の融合構築は、マルトース結合タンパク質 (MBP)、S-標識、Lexa DNA 結合ドメイン (DBD) 融合物、GAL4 DNA 結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス (HSV) BP16 タンパク質融合物を包含する。また、融合タンパク質はさらに、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質コード配列と非相同タンパク質配列の間に位置する開裂部位を含むよう組み立てることができ、その結果、このヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、開裂され、非相同部分を無くすように精製できる。

10

20

【0028】

融合タンパク質は当分野で周知のように化学合成できる。好ましくは、融合タンパク質は二つのポリペプチドセグメントを共有結合で連結することにより、または分子生物学分野で標準的な方法により調製する。例えば、当分野で知られているように、第二のポリペプチドセグメントをコードしているヌクレオチドを有する適切なリーディングフレームに配列番号 1 または 9 より選ばれるコード配列を含む DNA 構築物を作製し、この DNA 構築物を宿主細胞で発現させることによる組換え DNA 法を用いて、融合タンパク質を調製できる。融合タンパク質構築用の多くのキットが、Promega Corporation (Madison, WI)、Stratagene (La Jolla, CA)、CLONTECH (Mountain View, CA)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA)、および Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS) といった企業から入手できる。

30

【0029】

種相同体の同定

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のポリヌクレオチド (下記) を使用して他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来の cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングするために好適なプローブまたはプライマーを作製し、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の相同体をコードしている cDNA を同定し、そして当分野で周知のようにこの cDNA を発現させて、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の種相同体を得ることができる。

40

【0030】

ポリヌクレオチド

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖であってよく、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のコード配列又はその相補物を含んでいてもよい。ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のコード配列を、配列番号 1 および 9 に示す。

【0031】

ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている縮重ヌクレオチド配列、

50

および、配列番号 1 に示すヌクレオチド配列と少なくとも約 50、55、60、65、70、好ましくは約 75、90、96 または 98% 一致するホモローガスなヌクレオチド配列もまた、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドである。二つのポリヌクレオチド配列間の配列一致パーセントは、ALIGN のようなコンピュータプログラムを用いて決定するが、これは、ギャップオープンペナルティー - 12 およびギャップエクステンションペナルティー - 2 によるアフィンギャップ検索を用いる FASTA アルゴリズムを使用するものである。相補的 DNA (cDNA) 分子、種相同体および生物学的に活性なヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドの変異体もやはりヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドである。

10

【0032】

ポリヌクレオチド変異体および相同体の同定

上記のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチド変異体および相同体もまたヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドである。典型的には、相同ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチド配列は、当分野で周知のように、ストリンジェントな条件下で候補ポリヌクレオチドを既知のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドにハイブリダイズさせる細胞ことにより同定できる。例えば、以下の洗浄条件 - 2 X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)、0.1% SDS、室温 2 回、各々 30 分間；次いで 2 x SSC、0.1% SDS、50 1 回、30 分間；次いで 2 x SSC、室温 2 回、各々 10 分間 - を使用して、最大約 25 - 30% の塩基対ミスマッチ (不対合) を含む相同配列を同定できる。より好ましくは、相同核酸鎖は 15 - 25% の塩基対ミスマッチを、さらに好ましくは 5 - 15% の塩基対ミスマッチを含む。

20

【0033】

本明細書に開示するヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドの種相同体はさらに、適当なプローブまたはプライマーを作製し、他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来の cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングすることによって同定できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドのヒト変異体は、例えばヒト cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングすることにより同定できる。二本鎖 DNA の T_m は相同性が 1% 低下する毎に 1 - 1.5 低下することがよく知られている (Bonnerら、J. Mol. Biol. 81, 123 (1973))。故にヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドの変異体または他の種のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドは、推定の相同ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドを、配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズさせて被験ハイブリッドを作製することによって同定できる。被験ハイブリッドの融解温度を完全に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含むハイブリッドの融解温度と比較し、被験ハイブリッド中の塩基対ミスマッチの数またはパーセントを算出する。

30

【0034】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件に従いヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするヌクレオチド配列もまたヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドである。ストリンジェントな洗浄条件は当分野で周知且つ理解されており、例えば Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., 1989, 9.50 - 9.51 頁に開示されている。

40

【0035】

典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のためには、温度と塩濃度の組み合わせを、検討中のハイブリッドの理論的 T_m よりおよそ 12 - 20 低くなるよう選択すべきである。配列番号 1 または 6 に示すヌクレオチド配列を有するヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドまたはその相同体と、それらのヌクレオチ

50

ド配列のいずれか1つと少なくとも約50、55、60、65、70、好ましくは約75、90、96、または98%一致するポリヌクレオチド配列とのハイブリッドの T_m は、例えばBoltonおよびMcCarthy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1390 (1962)の式:

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 0.63 (\%ホルムアミド) - 600/l,$$

[式中、 l = 塩基対で表したハイブリッドの長さ]

を用いて算出できる。

【0036】

ストリンジェントな洗浄条件としては例えば、 $4 \times SSC$ (65)、または50%ホルムアミド、 $4 \times SSC$ (42)、または $0.5 \times SSC$ 、0.1%SDS (65)が挙げられる。高度ストリンジェントな洗浄条件は、例えば $0.2 \times SSC$ (65)などである。

【0037】

ポリヌクレオチドの調製

天然に存在するヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドは、膜構成成分、タンパク質および脂質といった他の細胞成分を含まないよう単離できる。ポリヌクレオチドは細胞から調製でき、標準的核酸精製技術を用いて単離、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような増幅技術を用いて合成、若しくは自動合成機を用いることによって調製できる。ポリヌクレオチドを単離する方法は機械的であり、当分野で知られている。ポリヌクレオチドを取得するためこのような任意の技術を用いて、単離されたヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、制限酵素およびプローブを用いてヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド断片を単離できる。単離したポリヌクレオチドは他の分子を含まないか、あるいは少なくとも70、80、または90%含まない調製物である。

【0038】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質cDNA分子は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質mRNAを鋳型に用いて標準的分子生物学技術にて調製できる。その後ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質cDNA分子は、当分野で周知でありSambrookら。(1989)のようなマニュアルに開示される分子生物学技術を用いて複製できる。ヒトゲノムDNAまたはcDNAのいずれかを鋳型として使用して本発明に係るポリヌクレオチドのさらなるコピーを得るため、PCRのような増幅技術を用いることができる。

【0039】

別法として、合成化学技術を用いてヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドを合成することもできる。遺伝コードの縮重により、例えば配列番号2、10、11に示すアミノ酸配列を有するヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはその生物学的に活性な変異体をコードする別のヌクレオチド配列の合成を可能にする。

【0040】

完全長ポリヌクレオチドの入手

PCRに基づく様々な方法を用いて、配列番号1および9に開示した核酸配列を伸長させ、プロモーターおよび調節要素といった上流配列を検出することができる。例えば制限部位PCRは、既知の座に隣接する未知配列を検索するため、ユニバーサルプライマーを使用する(BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., eds., Elsevier Press, N.Y., 1986)。まず、ゲノムDNAを、リンカー配列に対するプライマーと既知領域に特異的なプライマーの存在下で増幅する。次に、増幅させた配列を、同じリンカープライマーと最初のもの内部にある別の特異的プライマーを用いて、第二回目のPCRを行なう。各回のPCR産物を適当なRNAポリメラーゼで転写し(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037)逆転写酵素を行い

10

20

30

40

50

て配列決定する (Sambrook et al., 1989, pg. 1.20)。

【0041】

既知領域に基づく異なるプライマーを用いて配列を増幅または伸長するために、逆PCRを使用することもできる (Davis et al., 1986)。市販ソフトウェアを用いて、標的配列とアニーリングするプライマーを設計できる。この方法は、幾つかの制限酵素を用いて、遺伝子の既知領域に適当な断片を作り出細胞。次いでこの断片を分子内ライゲーションにより環化し、PCR鑄型として使用する。生じる放射能画像のプレートを複写するために比較する。各スポットは、ポジティブなコロニーかプラークに相当する。コロニーあるいはプラークは選択され拡張される。また、DNAは詳しい分析および配列用のコロニーから分離する。

10

【0042】

ポジティブなcDNAクローンはそれらが、部分的な配列からの1つのプライマーおよびベクターからの別のプライマーを備えたPCRを使用して含んでいる、補足配列の量を決定すると分析される。クローンで、1つの、より大きな、オリジナルの部分的な配列よりPCR産物をベクター挿入する、mRNAサイズがノーザンブロットング分析から決定するとともに、それらが同じ大きさのインサートを含むかどうか決めるために順番に並べる、制限消化およびDNAによって分析されるか類似している。

【0043】

使用できるもう一つの方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む、エキソヌクレアーゼIIIである (McCombie et al., Methods 3, 33-40, 1991)。この方法では、作製した二本鎖配列を、PCRの実施前に当該DNA分子の未知断片中に入れるため、さらに複数の制限酵素消化とライゲーションを行うことができる。

20

【0044】

様々なPCRに基づいた方法はプロモーターおよび規定する要素のように上流に検知するキナーゼ様蛋白質が順番に並べる、ヒトスフィンゴシンの示された部分をコード化する核酸配列を拡張するために使用することができた。例えば、制限部位PCRは、既知の軌跡 (SarkarおよびPCR方法Applic. 2, 318-322, 1993年)に隣接している未知の配列を検索するために普遍的なプライマーを使用する。ゲノムのDNAは、結合物配列へのプライマーおよび既知の領域への効薬がある状態で最初に増幅される。その後、増幅された配列は、同じ結合物プライマー、および第1のものに内部別の特定のプライマーを備えたPCRの第2ラウンドにさらされる。PCRの各丸の産物は適切なRNAポリメラーゼで転写され、逆転写酵素を使用して順番に並べられる。

30

【0045】

さらに逆PCRは、既知の領域 (Triglia et al., Nucleic Acids Res. 16, 8186, 1988)に基づいた分岐するプライマーを使用して、配列を増幅するか拡張するために使用することができた。プライマーはOLIGO 4.06のように、商業的に利用可能なソフトウェアを使用して、設計することができた、分析ソフトウェア (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn)、50%以上のGCの内容を持っており、かつ緩冷するために長さで22-30のヌクレオチドであるために、約68-72の温度で目標配列をアニールする。方法は、遺伝子の既知の領域の適切な破片を生成するためにいくつかの制限酵素を使用する。その後、分子内の酵素によって破片に切断される。また、その破片はPCRテンプレートとして使用される。

40

【0046】

未知配列を回収するために使用できるもう一つの方法はPCR (それはヒトとイーストの中の既知の配列に隣接しているDNA破片のPCR増幅を含んでいる)を捕らえる、人工染色体DNA (Lagerstromら、Applic PCR法. 1, 111-119, 1991年)である。この方法では、多数の制限酵素消化がPCRを実行する前に、DNA分子の未知の破片に巧みに計画された二重らせん構造の配列を入れるために使用さ

50

れる。

【0047】

未知配列を回収するために使用できるもう一つの方法はParkerら、Nucleic Acids Res. 19, 3055-3060, 1991の方法である。さらに、PCR、ネステッド(nested)プライマー、およびPROMOTERFINDERライブラリー(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)を用いてゲノムDNA歩行を行なうことができる(CLONTECH, Palo Alto, Calif.)。このプロセスはライブラリーをスクリーニングする必要性を排除し、イントロン/エクソン接合点の発見に有用である。

【0048】

スクリーニングで完全長cDNAを求める場合、より大きなcDNAを含むようサイズ選択したライブラリーを使用するのが望ましい。遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含んでいるという点で、無作為プライミングしたライブラリーが好ましい。無作為プライミングしたライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを産生しない状況で特に好ましいであろう。ゲノムライブラリーは、配列を5'非転写調節領域へと伸長さ細胞のに有用な場合がある。

【0049】

市販品が入手可能な毛細管電気泳動系を用いて、PCRまたは配列決定産物のサイズを分析、またはヌクレオチド配列を確認することができる。例えば、毛細管配列決定は、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザー励起する4種の異なる蛍光色素(各ヌクレオチドにつき1種ずつ)、および電荷結合素子カメラによる放射された波長の検出を利用することができる。出力/光強度は適当なソフトウェア(例えばGENOTYPERおよびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer)を用いて電気シグナルに変換でき、試料のロードからコンピューター分析および電子的データ表示に至る全プロセスをコンピューター管理することができる。毛細管電気泳動は、特定の試料中に限られた量で存在するかも知れないDNAの小片を配列決定するのに特に好ましい。

【0050】

ポリペプチドの取得

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、例えばヒト細胞からの精製によって、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドの発現によって、または直接的化学合成によって取得できる。

【0051】

タンパク質精製

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を、その酵素を発現する任意の細胞(HCT 116, DLD1, HT29, Caco2, SW837, SW480, およびRKO, 乳癌細胞系21-PT, 21-MT, MDA-468, SK-BR3, およびBT-474, A549を含む)から精製することができる。ヒト正常上皮細胞および初期癌細胞は、セリンプロテアーゼDESC1ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の特に有用なソースを提供する。精製ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、当分野で周知の方法を用いて、細胞内でヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と通常会合している他の化合物、例えば特定のタンパク質、炭水化物または脂質から分離される。そのような方法には、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび調製用ゲル電気泳動が挙げられるが、これらに制限されない。精製ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の調製は、少なくとも80%純粋; 90%、95%または99%純粋な調製であることが好ましい。調製物の純度は当分野で周知の任意の方法、例えばLin et al., Biol. Chem. 274, 18231-36, 1999に記載のSDSポリキャピラリーゲル電気泳動によって評価できる。

【0052】

ポリヌクレオチドの発現

10

20

30

40

50

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドを発現させる細胞のため、挿入されたコード配列の転写と翻訳に必要な要素を含む発現ベクター中にそのポリヌクレオチドを挿入することができる。当業者に周知の方法を利用して、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列および適当な転写および翻訳調節要素を含む発現ベクターを構築できる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えがある。このような技術は、例えばSambrookら、(1989)およびAusubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York., 1989に記載されている。

【0053】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列を含み、そして発現する様々な発現ベクター/宿主系が利用できる。これらには、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌；酵母発現ベクターにより形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）により感染を受けた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）、若しくは細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）により形質転換された植物細胞系、または動物細胞系が包含されるがこれらに限定される訳ではない。

【0054】

調節要素または調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写と翻訳を実行するベクターの非翻訳領域 - エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域 - である。かかる要素はその強さと特異性において異なっている。利用するベクター系および宿主に応じて、構成的および誘導的プロモーターを包含する、多数の好適な転写および翻訳要素を使用できる。例えば、細菌系でクローニングを行う場合、BLUESCRIPTファージミド (Stratagene, La Jolla, Calif.) またはpSPORT1プラスミド (Life Technologies) 等のハイブリッドlacZプロモーターのような誘導的プロモーターを使用できる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に使用できる。植物細胞のゲノムから誘導したプロモーターまたはエンハンサー（例えば熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子）、または植物ウイルスから誘導したプロモーターまたはエンハンサー（例えば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列）を該ベクター中にクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来の、または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているヌクレオチド配列を複数コピー含む細胞系を作製する必要がある場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択マーカーと共に使用することができる。

【0055】

細菌および酵母発現系

細菌系では、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に対して意図する用途に応じて幾つかの発現ベクターを選択できる。例えば、抗体の誘導のため、大量のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質が必要である場合は、容易に精製できる融合タンパク質の高レベル発現を指令するベクターが使用できる。このようなベクターは、BLUESCRIPT (Stratagene) のような多機能E.coliクローニングおよび発現ベクターを包含するが、これに限定される訳ではない。BLUESCRIPTベクターにおいては、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列を、 - ガラクトシダーゼのアミノ末端Metとこれに続く7残基の配列と共にフレーム内で該ベクター中にライゲーションすることができ、その結果ハイブリッドタンパク質が産生される。pINベクター (Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 264, 5503-5509, 1989) またはpGEXベクター (Promega, Madison, Wis.) もまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を伴う融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させる細胞のに使用できる。一般に、こ

10

20

30

40

50

のような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン - アガロースビーズに吸着させ、その後遊離グルタチオンの存在下で溶離することにより、溶菌させた細胞から容易に精製できる。このような系で調製したタンパク質は、ヘパリン、トロンピン、または第 X a 因子プロテアーゼ開裂部位を含むよう設計でき、その結果、目的とするクローンポリペプチドを GST 部分から随意に解放することができる。

【0056】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、因子、アルコールオキシダーゼ、および PGH のような構成的または誘導的プロモーターを含む幾つかのベクターが使用できる。総説として Ausubel ら、(1989) および Grant ら、*Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987 を参照されたい。

10

【0057】

植物および昆虫発現系

植物発現ベクターを使用する場合、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列の発現は、幾つかのプロモーターのうち任意のものにより駆動できる。例えば、CaMV の 35S および 19S プロモーターのようなウイルスプロモーターを、単独で、または TMV 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用できる (Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987)。別法として、RUBISCO の小サブユニットのような植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを使用することもできる (Coruzzi ら、*EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglie ら、*Science* 224, 838-843, 1984; Winter ら、*Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991)。これらの構築物は、直接 DNA 形質転換または病原体媒介トランスフェクションにより植物細胞中に導入できる。このような技術は、幾つかの一般に入手可能な総説に記載されている (例えば、Hobbs または Murray、*McGraw Hill Year Book of Science and Technology*, McGraw Hill, New York, N.Y., pp 191-196, 1992)。

20

【0058】

昆虫系もまたヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の発現に使用できる。例えば、かかる系の 1 つ *Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) は、*Spodoptera frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* の幼虫で外来遺伝子を発現させる細胞ベクターとして使用する。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列を、ポリヘドリン遺伝子のような該ウイルスの非必須領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの調節下に置くことができる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をうまく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子は不活性化し、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが生成する。次いでこの組換えウイルスを *S. frugiperda* 細胞または *Trichoplusia* の幼虫への感染に使用し、そこでヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を発現させることができる (Engelhard ら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994)。

30

40

【0059】

哺乳動物発現系

ウイルスに基づく多くの発現系を用いて哺乳動物宿主細胞でヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を発現させることができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列は、後期プロモーターおよび 3 部に分かれたリーダー配列を含むアデノウイルス転写 / 翻訳複合体中にライゲーションできる。該ウイルスゲノムの非必須 E1 または E3 領域における挿入を用いて、感染宿主細胞においてヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を発現できる生存ウイルスを取得できる (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984)。所望によりラウス肉腫ウイルス

50

(RSV)エンハンサーのような転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞での発現を増大さ細胞ことができる。

【0060】

ヒト人工染色体(HAC)もまた、プラスミドが内包し発現するDNA断片よりも大きなDNA断片の運搬に使用できる。6Mから10MのHACを組み立て、常套的送達法により細胞に到達さ細胞(例えば、リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、または小胞)。

【0061】

さらに、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列のより効率的な翻訳を達成するために、特異的開始シグナルを使用できる。かかるシグナルはATG開始コドンおよび連続配列を包含する。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクター中に挿入した場合、さらなる転写または翻訳調節シグナルは必要ないであろう。しかしながら、コード配列またはその断片のみを挿入した場合は、外因性の翻訳調節シグナル(ATG開始コドンを包含する)を供給すべきである。開始コドンは挿入物全体を確実に翻訳さ細胞ために、正しいリーディングフレームになければならない。外因性翻訳要素および開始コドンは天然および合成両者の様々な起源であってよい。発現の効率は、使用する特定の細胞系に対し適切なエンハンサーを存在さ細胞ことにより増強できる(Scharfら、Results Probl. Cell Differ. 20, 125-162, 1994)。

【0062】

宿主細胞

宿主細胞菌株は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現されたヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を所望の方法で処理できる能力を目的として選択できる。該ポリペプチドのこのような修飾には、アセチル化、カルボキシ化、グリコシル化、燐酸化、脂質化、およびアシル化が包含されるがこれらに限定されない。該ポリペプチドの「プレプロ」型を開裂する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、折り畳み、および/または機能を促進するために使用できる。翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的メカニズムを持つ異なる宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293およびWI38)が、American Type Culture Collection(ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)から入手でき、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にするために選択できる。

【0063】

組換えタンパク質の長期高収量産生のために、安定な発現が好ましい。例えば、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を安定に発現する細胞系を、ウイルス複製起点および/または内因性発現要素、および同じまたは別のベクター上にある選択マーカー遺伝子を含む発現ベクターを用いて形質転換することができる。該ベクターの導入に続いて、細胞を強化培地で1-2日間生育させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択マーカーの目的は選択に対する抵抗性を付与することであり、その存在が、導入されたヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質配列をうまく発現する細胞の生育と回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型にとって適当な組織培養技術を用いて増殖さ細胞ことができる。例えば、ANIMAL CELL CULTURE, R. I. Freshney, ed., 1986を参照されたい。

【0064】

幾つかの選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収できる。これらには、それぞれtk^rまたはaprt^r細胞で使用できる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell 11, 223-32, 1977)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell 22, 817-23, 1980)遺伝子が包含されるが、これらに限定される訳ではない。さらに、代謝拮抗物質、抗生物質、または除草剤耐性を選択の基準に用いることができる。例えば、dhfrはメソトレキサートに

10

20

30

40

50

対する耐性を付与し (Wiglerら、Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567-70, 1980) nptはアミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を付与し (Colbere-Garapinら、J. Mol. Biol. 150, 1014, 1981)、そしてalsおよびpatはそれぞれクロルスフロロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する (Murray, 1992, 上記)。さらなる選択遺伝子が記載されている。例えば、trpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用するようにさせ、hisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用するようにさせる細胞 (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8047-51, 1988)。アントシアニンのような可視マーカー、 β -グルクロニダーゼとその基質GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンは、形質転換体を同定し、特異的ベクター系に帰すことのできる一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために使用できる (Rhodesら、Methods Mol. Biol. 55, 121-131, 1995)。

10

20

30

40

50

【0065】

発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドが存在することも示唆しているが、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の存在と発現は確認する必要がある。例えば、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列がマーカー遺伝子配列内部に挿入されている場合、誘導または選択にตอบสนองして、通常、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドの発現を示す。

【0066】

これとは別に、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドを含み、PI-ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を発現する宿主細胞は、当業者に知られる様々な方法によって同定できる。これらの方法には、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質生検またはイムノアッセイ技術(核酸またはタンパク質の検出および/または定量的ための膜、溶液、またはチップに基づく技術を含む)が含まれるがこれらに限定されない。例えば、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたは断片またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているポリヌクレオチドの断片を使用するDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって検出できる。核酸増幅に基づく検定は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を含む形質転換体を検出するための、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドをコードしている配列から選択されるオリゴヌクレオチドの使用を含む。

【0067】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に対し特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかを使用して該ポリペプチドの発現を検出および測定するための様々なプロトコルが当分野で知られている。例として、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)がある。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質上の2個の非干渉性エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる、2部位のモノクローナルに基づくイムノアッセイが使用でき、または、競合的結合検定を使用することができる。これらのおよびその他の検定はHamptomら、SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990およびMaddoxら、J. Exp. Med. 158, 1211-1216, 1983に記載されている。

【0068】

多岐にわたる標識およびコンジュゲーション技術が当業者に知られており、様々な核酸およびアミノ酸検定に使用できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための標識化ハイブリダイゼーションま

たはPCRプローブを調製する手段は、標識したヌクレオチドを使用する、オリゴ標識化、ニック翻訳、末端標識化、またはPCR増幅を包含する。これとは別に、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列を、mRNAプローブの産生のためのベクター中にクローニングすることもできる。このようなベクターは当分野で既知であり、市販品が入手でき、標識化ヌクレオチドおよび適当なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3、またはSP6を添加することによりインビトロでのRNAプローブの合成に使用することができる。これらの方法は、市販の様々なキットを用いて実施できる(Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemical)。検出を容易にするために使用できる適当なりポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、および蛍光、化学ルミネセント、または色素生成物質、ならびに基質、補助因子、インヒビター、磁性粒子などが包含される。

10

【0069】

ポリペプチドの発現および精製

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているヌクレオチド配列で形質転換させた宿主細胞は、発現と、細胞培養からのタンパク質の回収に適した条件下で培養できる。形質転換細胞により産生されたポリペプチドは、その配列および/または使用したベクターに応じて分泌されまたは細胞内に貯留され得る。当業者には理解できるであろうが、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通った可溶性ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の分泌を指令する、または膜結合ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の膜挿入を指令する、シグナル配列を含むよう設計できる。

20

【0070】

上に論じたように、他の構築物を用いて、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列を、可溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードしているヌクレオチド配列と結合させることができる。このような精製促進ドメインは、金属キレート化ペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質Aドメイン、およびFLAG伸長/親和精製系で利用するドメインが包含されるが、これらに限定されない(ImmuneX Corp., Seattle, Wash.)。精製ドメインとヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質との間に開裂可能リンカー配列、例えば第Xa因子またはエンテロキナーゼに特異的なリンカー配列を入れること(Invitrogen, San Diego, CA)もまた、精製を促進するために利用できる。このような発現ベクターの1つは、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ開裂部位に先立つ6個のヒスチジン残基とを含む融合タンパク質の発現を提供する。このヒスチジン残基はIMAC(Porathら、Prot. Exp. Purif. 3, 263-281, 1992に記載の固定化金属イオン親和クロマトグラフィー)による精製を促進し、一方エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からのヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の精製手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターはKrollら、DNA Cell Biol. 12, 441-453, 1993に開示されている。

30

40

【0071】

化学合成

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしている配列は、その全体または一部を、当分野で周知の化学的方法を用いて合成できる(Caruthersら、Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, 1980; Hornら、Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980)。これとは別に、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質自身を、そのアミノ酸配列を合成するための化学的方法、例えば固相技術を用いる直接ペプチド合成を用いて調製できる(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154, 1963; Robergeら、Science 269, 202-204, 1995)。タンパク

50

質合成は手動技術またはオートメーションを用いて実施できる。自動化合成は、例えば Applied Biosystems 431A ペプチド合成機 (Perkin Elmer) を用いて達成できる。所望により、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の断片を別々に合成し、化学的方法を用いて合して完全長の分子を調製することもできる。

【0072】

新たに合成したペプチドは、調製用高速液体クロマトグラフィー (例えば Creighton, PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES, WH Freeman and Co., New York, N. Y., 1983) により実質的に精製できる。合成ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の組成はアミノ酸分析または配列決定により確認できる (例えばエドマン分解法; Creighton、上記を参照されたい)。さらに、直接合成中にヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のアミノ酸配列の任意の部分を改変させ、そして/または化学的方法を用いて他のタンパク質由来の配列と合して、変異体ポリペプチドまたは融合タンパク質を調製することができる。

10

【0073】

改変ポリペプチドの調製

当業者には理解できるであろうが、天然に存在しないコドンをもつヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質コード化ヌクレオチドを調製することは有利であり得る。例えば、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増大させ、または所望の性質、例えば天然に存在する配列から産み出される転写物の半減期より長い半減期を持つ RNA 転写物を調製することができる。

20

【0074】

本明細書に開示するヌクレオチド配列は、当分野で一般的に知られる方法を用いて、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質または mRNA 産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する改変を包含する (但しこれらに限定される訳ではない) 様々な理由で、該ポリペプチドコード配列を改変さ細胞ように設計できる。無作為断片化による DNA シャフリングと遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドの PCR 再集合を用いてヌクレオチド配列を設計できる。例えば、位置指定突然変異誘発を用いて、新たな制限部位を挿入し、グリコシル化パターンを変え、コドンの優先性を変え、スプライス変異体を調製し、突然変異を導入する等を実施できる。

30

【0075】

抗体

当分野で知られているいかなる型の抗体も、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のエピトープに特異的に結合するよう作製できる。本明細書で使用する「抗体」とは、無傷の免疫グロブリン分子、およびその断片、例えば Fab、F(ab')₂、および Fv を包含し、これらはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のエピトープに結合できる。典型的には、エピトープを形成するためには少なくとも 6、8、10、または 12 の連続するアミノ酸が必要である。しかしながら、非連続アミノ酸を含むエピトープはより多くの、例えば少なくとも 15、25、または 50 のアミノ酸を必要とするかも知れない。

【0076】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のエピトープに特異的に結合する抗体は治療に使用でき、そして免疫化学検定、例えばウェスタンブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学検定、免疫沈降、またはその他の当分野で既知の免疫化学的検定に使用できる。所望の特異性を有する抗体の同定のため、様々なイムノアッセイが使用できる。競合的結合または免疫放射検定のための多数のプロトコルが当分野でよく知られている。このようなイムノアッセイは典型的には、免疫原と、その免疫原に特異結合する抗体との間の複合体形成の測定を含んでいる。

40

【0077】

典型的には、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に特異的に結合する抗体は、免疫化学検定に使用する時、他のタンパク質が提供する検出シグナルより少なくとも 5、10

50

、または20倍高い検出シグナルを提供する。好ましくは、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に特異結合する抗体は、免疫化学検定で他のタンパク質を検出せず、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を溶液から免疫沈降させることができる。

【0078】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、またはヒトを免疫してポリクローナル抗体を産生させる細胞のに使用できる。所望により、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、担体タンパク質、例えば牛血清アルブミン、チログロブリン、およびスカシガイヘモシアニンとコンジュゲートさせることができる。宿主の種に応じて、免疫学的反応を増大させる細胞のために種々のアジュバントを使用できる。このようなアジュバントは、フロイントアジュバント、鉍物性ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および界面活性物質（例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノール）を包含するがこれらに限定されない。ヒトに使用するアジュバントの中ではBCG (*Bacilli Calmette - Guerin*) および *Corynebacterium parvum* が特に有用である。

10

【0079】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養中の連続的細胞系により抗体分子の産生を提供する任意の技術を用いて調製できる。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術があるがこれらに限定されない (Kohlerら、*Nature* 256, 495-497, 1985; Kozborら、*J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Coteら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Coleら、*Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984)。

20

【0080】

さらに、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして適当な抗原特異性と生物活性を持つ分子を得る、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が利用できる (Morrissonら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neubergerら、*Nature* 312, 604-608, 1984; Takedaら、*Nature* 314, 452-454, 1985)。モノクローナルおよびその他の抗体はまた、これを治療に使用した場合に患者が該抗体に対する免疫反応を起こすのを防ぐため、「ヒト化」することができる。このような抗体は、治療に直接使用できるほど配列が充分ヒトに類似しているかも知れず、または幾つかの重要残基の変更を必要とするかも知れない。齧歯類の抗体とヒト配列の間の配列相違は、個々の残基の位置指定突然変異誘発により、または相補性決定領域全体の格子により、ヒト配列内の残基と相違する残基を置き換えることによって最小化することができる。別法として、ヒト化抗体はGB2188638Bに記載のように組換え法を用いて調製できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に特異的に結合する抗体は、U.S. 5565332に開示のように、部分的または完全にヒト化した抗原結合部位を含むことができる。

30

【0081】

これに代わり、当分野で既知の方法を用いて、一本鎖抗体の調製のために記載した技術を適合させ、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に特異結合する一本鎖抗体を調製することができる。関連する特異性を持つが別個のイデオタイプ組成を有する抗体を、無作為組み合わせ免疫グロブリンライブラリーから鎖シャフリングによって調製することができる (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991)。

40

【0082】

一本鎖抗体はまた、ハイブリドーマcDNAを鋳型に用いて、PCRのようなDNA増幅法を用いて組み立てることができる (Thirionら、1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11)。一本鎖抗体は単一または二重特異性であり得

50

、また、二価または四価であり得る。四価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては例えば Coloma & Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63 に教示されている。二価二重特異性一本鎖抗体の組み立ては Mallender & Voss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206 に教示されている。

【0083】

下記のように、一本鎖抗体をコードしているヌクレオチド配列を手動または自動ヌクレオチド合成を用いて組み立て、標準的組換えDNA法を用いて発現構築物中にクローニングし、そして細胞中に導入してコード配列を発現させることができる。別法として、一本鎖抗体を、例えば糸状ファージ技術を用いて直接調製することもできる (Verhaarら、1995, Int. J. Cancer 61, 497-501; Nichollら、1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91)。

10

【0084】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に特異結合する抗体はまた、リンパ球集団においてインビボ産生を誘導することによって、または、文献に開示されている極めて特異的な結合試薬のパネルまたは免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって調製することもできる (Orlandiら、Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winterら、Nature 349, 293-299, 1991)。

【0085】

その他の型の抗体を、本発明方法において組み立て、治療に使用することができる。例えば、WO93/03151に開示のように、キメラ抗体を組み立てることができる。免疫グロブリンから誘導され多価且つ多重特異的である結合タンパク質、例えばWO94/13804に記載の「diabodies」もまた調製できる。

20

【0086】

本発明に係る抗体は当分野で周知の方法により精製できる。例えば、抗体は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質が結合しているカラムを通過させ細胞ごとにより親和精製できる。次いで、結合した抗体を、高い塩濃度の緩衝液を用いてカラムから溶出することができる。

【0087】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のDNAまたはRNA配列に対し相補的なヌクレオチド配列である。いったん細胞中に導入されるとこの相補的なヌクレオチドは、該細胞が産生した天然配列と結合して複合体を形成し、転写または翻訳のいずれかを遮断する。好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも11ヌクレオチド長であるが、少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45、若しくは50またはそれ以上のヌクレオチド長であってもよい。より長い配列もまた使用できる。アンチセンスオリゴヌクレオチド分子をDNA構築物に提供し、上記のように細胞中に導入して、その細胞におけるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

30

40

【0088】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはこの両者の組み合わせであってもよい。オリゴヌクレオチドは、1つのヌクレオチドの5'末端を、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロアミデート、燐酸エステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル、カルボネート、および燐酸トリエステルといった非ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する別のヌクレオチドの3'末端と共有結合させることにより、手動で、または自動合成機によって合成できる。Brown, Meth. Mol. Biol. 20, 1-8, 1994; Sonveaux, Meth. Mol. Biol. 26, 1-72, 1994; Uhlman

50

nら、Chem. Rev. 90, 543-583, 1990を参照されたい。

【0089】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子の制御、5'、または調節領域と二本鎖を形成するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することにより、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子発現の修飾が得られる。転写開始部位、例えば開始部位から-10および+10位の間から誘導されるオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、「三重らせん」塩基対合法を用いて阻害を達成できる。三重らせん対合は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子またはシャペロンの結合に対して十分に開くという能力の阻害を引き起こすため、有用である。三本鎖DNAを用いる治療上の進歩が文献に記載されている(例えばGeeら、Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994)。転写物がリボソームに結合するのを防ぐことによりmRNAの翻訳を遮断するアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた設計できる。

10

20

30

40

50

【0090】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドの相補配列との間に好結果の複合体を形成させる細胞ためには、正確な相補性は必要ない。例えばヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドに対し正確に相補的である2、3、4、若しくは5またはそれ以上の長さの連続するヌクレオチドを含み、その各々が、隣接するヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ヌクレオチドとは相補的ではない連続するある長さのヌクレオチドによって隔てられているアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質mRNAに対して充分な標的化特異性を提供できる。好ましくは、相補的な連続ヌクレオチドの長さはそれぞれ少なくとも4、5、6、7若しくは8またはそれ以上のヌクレオチド長である。非相補的な介入配列は、好ましくは1、2、3、または4ヌクレオチド長である。当業者は、アンチセンス-センスの対の算出融点を容易に使用して、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドと特定のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチド配列間で寛容されるミスマッチの程度を決定できるであろう。

【0091】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力に影響を及ぼすことなく修飾できる。これらの修飾は該アンチセンス分子の内部、または一端若しくは両端である。例えば、ヌクレオチド間の燐酸結合は、アミノ基と末端リボースの間にいるいるな数の炭素残基を有するコレステリルまたはジアミン部分を加えることによって修飾できる。修飾された塩基および/または糖、例えばリボースの代わりにアラビノース、または3'ヒドロキシ基または5'燐酸基が置換されている3', 5'-置換オリゴヌクレオチドもまた修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドに使用できる。これらの修飾オリゴヌクレオチドは当分野で周知の方法により調製できる。例えば、Agrawalら、Trends Biotechnol. 10, 152-158, 1992; Uhlmannら、Chem. Rev. 90, 543-584, 1990; Uhlmannら、Tetrahedron Lett. 215, 3539-3542, 1987を参照されたい。

【0092】

リボザイム

リボザイムは触媒活性を有するRNA分子である。例えば、Cech, Science 236, 1532-1539; 1987; Cech, Ann. Rev. Biochem. 59, 543-568; 1990, Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 605-609; 1992, Couture & Stinchcomb, Trends Genet. 12, 510-515, 1996を参照されたい。当分野で知られるように、リボザイムは、RNA配列を開裂することにより遺伝子機能を阻害するのに使用できる(例えば、Haseloffら、米国特許5641673)。リボザイムの作用機構は、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブ

リダイゼーションと、その後のエンドヌクレオ分解的 (endonucleolytic) 開裂を含む。例には、特異的ヌクレオチド配列のエンドヌクレオ分解的開裂を特異的且つ効果的に触媒できる、設計されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子がある。

【0093】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドのコード配列を用いて、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドから転写された mRNA に特異結合するリボザイムを作製できる。他のトランスの RNA 分子を極めて配列特異的に開裂できるリボザイムを設計し組み立てる方法が開発され、当分野で記載されている (Haseloffら、Nature 334, 585-591, 1988)。例えば、リボザイムの開裂活性は、別個の「ハイブリダイゼーション」領域を該リボザイム中に組み入れることによつて、特定の RNA を標的とさ細胞ことができる。このハイブリダイゼーション領域は標的 RNA に対し相補的な配列を含んでおり、したがつてその標的と特異的にハイブリダイズする (例えば Gerlachら、EP 3 212 01 を参照されたい)。

10

【0094】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質 RNA 標的内部の特異的リボザイム開裂部位は、この標的分子を、以下の配列：GUA、GUU、および GUC を包含するリボザイム開裂部位についてスキャンすることにより同定できる。同定できたならば、該開裂部位を含む標的 RNA の領域に対応する、15 および 20 の間のリボヌクレオチドを有する短い RNA 配列を、標的を非機能的にし得る二次構造の特徴について評価できる。さらに、候補のヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質 RNA 標的の適合性を、リボヌクレアーゼ防護検定を用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する利用可能性を試験することによつて評価できる。より長い相補配列を用いて、標的に対するハイブリダイゼーション配列の親和性を増大さ細胞ことができる。リボザイムのハイブリダイズおよび開裂する領域は、相補領域を介して標的 RNA にハイブリダイズする時、リボザイムの触媒領域が標的を開裂し得るといったように、完全に相関している。

20

【0095】

リボザイムは DNA 構築物の一部として細胞内に導入できる。マイクロ注入、リボソーム媒介トランスフェクション、電気穿孔、または燐酸カルシウム沈殿といった機械的方法を用いて、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質発現の低下が望まれる細胞中にリボザイム含有 DNA 構築物を導入することができる。これとは別に、細胞が DNA 構築物を安定的に保持することが望まれる場合は、該構築物をプラスミド上で供給し、当分野で知られるように、別個の要素として維持するか、または細胞のゲノム中に組み込むことができる。リボザイムコード化 DNA 構築物は、細胞中のリボザイムの転写を調節するために、プロモーター要素、エンハンサーまたは UAS 要素、および転写ターミネーターシグナルといった転写調節要素を含み得る。

30

【0096】

リボザイムは DNA の構築物するとともに細胞へ導入することができた。顕微鏡下注射、リボソームを媒介としたトランスフェクション、エレクトロポレーションあるいはリン酸カルシウム沈殿のような機械的方法はリボザイムを含んでいる DNA を導入するために使用することができた。構築物を、それがスフィンゴシンを減少さ細胞と望まれる細胞へ、キナーゼ様蛋白質を発現さ細胞。二者択一で、細胞が安定して DNA を保持することが望まれる場合、構築する、それはプラスミド上で供給することができ、個別の要素として維持する。あるいは当分野で知られている細胞のゲノムへ統合される。DNA、構築する、細胞のリボザイムの転写のコントロールのためにプロモーター要素、エンハンサー、UAS 要素、およびターミネーターシグナルのような規定する要素を含むことができた。

40

【0097】

Haseloffら、米国特許 5 641 673 に教示のように、リボザイムは、標的遺伝子の発現を誘導する因子に回答してリボザイムの発現が起こるように設計することができる。リボザイムはまた、追加レベルの調節を提供するよう設計でき、その結果、mRNA の破壊はリボザイムと標的遺伝子の両者が細胞に誘導された時にのみ起こる。

50

【0098】

示差的に発現した遺伝子

産物が蛋白質キナーゼのようなヒトスフィンゴシンと対する遺伝子の識別用方法はここに記述される。そのような遺伝子は、含んでいる障害で示差的に発現されるが、制限されない遺伝子を発現し得る、癌、アレルギーを含んでいるが喘息、中枢障害および末梢神経系障害また自己免疫疾患に制限されていなかった。さらに、そのような遺伝子は、そのような疾病の進行か治療に適切な操作に応じて差別的に調節される遺伝子を発現し得る。さらに、そのような遺伝子は増加し、一時的に調節された発現を行っているかもしれないか、あるいは組織か有機物の異なる段階で減少する。示差的に発現された遺伝子は、さらにコントロール対実験の条件の下でその発現を調節し得る。さらに、ヒトスフィンゴシン、キナーゼ様遺伝子あるいは遺伝生成物それ自体差異の発現に関して試験する。

10

【0099】

病気の状態において発現が異なる程度は、差異のディスプレイ技術のような標準の特性を記述する技術によって視覚化されるように単に十分に大きい必要があります。発現差が視覚化されるかもしれないような他の標準の特性記述技術としては量的RT、PCR（逆転写酵素）、またノーザン分析が含まれるがこれに制限されない。

【0100】

示差的発現した遺伝子の同定

示差的発現した遺伝子の識別示差的に発現された遺伝子を識別するために、RNAあるいは総rmRNAを目的組織から分離する。例えば、RNAサンプルは、実験の組織およびコントロールの対応組織から得られます。mRNA分離に対して選択しないどんなRNA隔離技術もそのようなRNAサンプルの精製のために利用し得る（例えばAusubel et al., ed. "CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993）。多くの組織サンプルは、例えばChomczynski, U.S. 特許4,843,155の単一のステップのRNA隔離プロセスのように、当業者に周知の技術を使用して、容易に処理される。

20

【0101】

示差的に発現された遺伝子によって酸性されたRNAを集めたRNAサンプル内の記録は、当業者に周知の方法によって識別される。それらは例えば、差異ふるい分け（Tedder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 208-12, 1988）をがふくまれる。Sci. U.S.A. 85, 208-12, 1988年、ハイブリダイゼーション（Hedrick et al., Nature 308, 149-53; Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2825, 1984）および示差的ディスプレイ（Liang & Pardee, Science 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 5,262,311）特許5,262,311が含まれる。

30

【0102】

それ自体、ヒトスフィンゴシンを含む病気の治療用の適切な方法を示唆する、キナーゼ様蛋白質。例えば、処理は、示差的に発現された遺伝子および（または）蛋白質キナーゼのようなヒトスフィンゴシンをコード化する遺伝子の発現の調節を含んでいるかもしれない。示差的発現の情報は示すかもしれませんが、かどうか、発現か活性、その、示差的に発現された遺伝子か遺伝生成物、あるいは遺伝子か遺伝生成物キナーゼのようなヒトスフィンゴシンは上の調節されるか下方調節される。

40

【0103】

スクリーニング方法

本発明は、調節物質、即ち、それはスフィンゴシンにキナーゼ様蛋白質ポリペプチドあるいはポリヌクレオチドを結合、または、例えばスフィンゴシンの発現あるいは活性に刺激的か抑制する効果があるする候補または試験化合物を同定する方法を提供する。キナーゼ様蛋白質ポリペプチドあるいはポリヌクレオチド、ポリアミンの低下を調節するために減

50

少しした細胞内のシグナリングは、有害な細胞が転移するのを防ぐか抑えるのに役立つ。

【0104】

本発明は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドに結合する、またはその活性を調節する、被験化合物をスクリーニングするための検定を提供する。好ましくは、被験化合物はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはポリヌクレオチドに結合する。より好ましくは、被験化合物は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を、被験化合物の不在時に比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下または増大さ細胞。

【0105】

被験化合物

被験化合物は当分野で既知の薬理的物質であってよく、または薬理活性を持っていることが前もって分かっている化合物であってよい。これらは、微生物、動物、または植物から単離されたものであってよく、そして組換え的に調製され、または当分野で既知の化学的方法により合成されたものであってよい。所望により被験化合物は、生物学的ライブラリー、空間的アドレス特定可能な並行固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを要する合成ライブラリー法、「一ビーズ化合物」ライブラリー法、および親和クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する(Lam, et al., Nature 354, 82-84, 1991; Houghten et al., Nature 354, 84-86, 1991) 当分野で既知の数多くの組み合わせライブラリー法のいずれかを用いて取得できる。生物学的ライブラリーアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されているが、他の4種のアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、Fab, F(ab')₂ およびFab発現が含まれる。

【0106】

化合物は天然に存在する、または実験室で設計されたものであってよい。これらは、微生物、動物、または植物から単離されたものであってよく、そして組換え的に調製され、または当分野で既知の化学的方法により合成されたものであってよい。所望により被験化合物は、生物学的ライブラリー、空間的アドレス特定可能な並行固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを要する合成ライブラリー法、「一ビーズ化合物」ライブラリー法、および親和クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を包含する(但しこれらに限定される訳ではない) 当分野で既知の数多くの組み合わせライブラリー法のいずれかを用いて取得できる。生物学的ライブラリーアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されているが、他の4種のアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用できる。Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997を参照されたい。

【0107】

分子ライブラリーの合成法は当分野でよく知られている(例えば、DeWittら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erbら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermannら、J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Choら、Science 261, 1303, 1993; Carellら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carellら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallopら、J. Med. Chem. 37, 1233, 1994を参照されたい)。化合物のライブラリーは溶液で(例えば、Houghten, *Biotechniques* 13, 412-421, 1992)、またはビーズ(Lam, Nature 354, 82-84, 1991)、チップ(Fodor, Nature 364, 555-556, 1993)、細菌または孢子(Ladner、米国特許5223409) プラスミド(Cullら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1865-1869, 1992)、またはファージ(Scott & Smith, Science 249, 38

10

20

30

40

50

6-390, 1990; Devlin, Science 249, 404-406, 1990); Cwirła, Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 6378-6382, 1990; Felici, J. Mol. Biol. 222, 301-310, 1991; および Ladner、米国特許5223409)上に提供できる。

【0108】

ハイスループットスクリーニング

被験化合物は、高(ハイ)スループットスクリーニングを用いて、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはポリヌクレオチドに結合する能力、またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性若しくはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子発現に影響を及ぼす能力についてスクリーニングできる。ハイスループットスクリーニングを使用して、多くの個別的化合物を並行して試験でき、その結果多数の被験化合物を迅速にスクリーニングできる。最も広範に確立されている技術は96ウェル微量定量プレートを利用するものである。この微量定量プレートのウェルは、典型的には50から500 μ lの範囲の検定容量を必要とする。このプレートに加えて、96ウェルフォーマットに適合させた多くの機器、材料、ピペット、ロボット、プレート洗浄機、およびプレート読み取り機が市販されている。

10

【0109】

別法として、「自由フォーマット検定」、または試料間に物理的障壁を持たない検定が使用できる。例えば、組み合わせペプチドライブラリーのための、単純な均質検定で色素細胞(メラノサイト)を用いる検定が、Jayawickremeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19, 1614-18(1994)に記載されている。ペトリ皿中のアガロースの下にこの細胞を入れ、次いで組み合わせ化合物を伴っているビーズをアガロースの表面に載細胞。組み合わせ化合物はこのビーズから化合物を部分的に放出する。化合物がゲルマトリックス中へと局所的に拡散するにつれて活性化化合物が細胞の色の变化を惹起するため、活性化化合物を暗色色素領域として視覚化することができる。

20

【0110】

自由フォーマット検定のもう一つの例は、生体分子スクリーニング学会第1回年次総会(Philadelphia, Pa., 1995年11月7-10日)で報告されたChelsky、「組み合わせライブラリーのスクリーニングのための戦略:新規な、そして伝統的なアプローチ」により記載されている。Chelskyは、カルボニックアンヒドラーゼのための単純な均質酵素検定をアガロースゲルの内部に入れ、その結果ゲル中の酵素がゲル全体に色の变化を惹起するようにさせた。その後、光リンカーを介して組み合わせ化合物を持つビーズをゲル内部に入れ、すると該化合物はUV光により部分的に放出された。酵素を阻害する化合物は、色の变化がより少ない局所阻害領域として観察された。

30

【0111】

さらに別の例がSalmonら、Molecular Diversity 2, 57-63(1996)に記載されている。この例では、組み合わせライブラリーを、寒天中で生育する癌細胞への細胞毒性効果を有する化合物についてスクリーニングした。

【0112】

もう一つのハイスループットスクリーニング法がBeutelら、米国特許5976813に記載されている。この方法では、被験試料を多孔性マトリックスに入れる。次に1またはそれ以上の検定成分を、マトリックス、例えばゲル、プラスチックシート、フィルター、またはその他の形の容易に操作できる固体担体の内部、上、または底に入れる。試料がこの多孔性マトリックスに導入されるとこれらは充分ゆっくりと拡散し、その結果、被験試料が混ざらずに検定が遂行できる。

40

【0113】

結合検定

結合検定について、被験化合物は、例えば本酵素のATP/GTP結合部位またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性部位に結合してこれを占有する結果、正常な生

50

物活性を妨げるような、小分子であることが好ましい。このような小分子の例は、小ペプチドまたはペプチド様分子を包含するが、これらに限定される訳ではない。結合検定では、被験化合物またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のいずれかが検出可能な標識、例えば蛍光、放射性同位元素、化学ルミネセント、または酵素標識（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ）を含むことができる。そこで、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に結合している被験化合物の検出は、例えば放射能の放出を直接計数することにより、またはシンチレーション計数により、または検出可能産物への適当な基質の変換を測定することにより、達成できる。

【0114】

別法として、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質への被験化合物の結合を、反応体のいずれをも標識せずに測定することができる。例えば、マイクロフィジオメーターを用いて、被験化合物とヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質との結合を検出できる。マイクロフィジオメーター（例えばサイトセンサーTM）とは、細胞がその環境を酸性化する速度を光アドレッシブル電位差センサー（LAPS）を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度の変化は、被験化合物とヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の相互作用の指標として使用できる（McConnellら、Science 257, 1906-1912, 1992）。

【0115】

被験化合物がヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に結合する能力の測定はまた、実時間Bimolecular Interaction Analysis（BIA）のような技術を用いて達成できる（Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338-2345, 1991、およびSzaboら、Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705, 1995）。BIAは、いかなる反応体をも標識せずに、生体特異的相互作用を実時間で研究するための技術である（例えばBIACore（登録商標））。光学的現象表面プラズモン共鳴（SPR）の変化を、生体分子間の実時間反応の指標に使用できる。

【0116】

本発明のさらに別の態様では、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を二ハイブリッド検定または三ハイブリッド検定（例えば、米国特許5283317；Zervosら、Cell 72, 223-232, 1993；Maduraら、J. Biol. Chem. 268, 12046-12054, 1993；Bartelら、Biotechniques 14, 920-924, 1993；Iwabuchiら、Oncogene 8, 1693-1696, 1993；およびBrent WO94/10300）における「おとりタンパク質」として使用し、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に結合またはこれと相互作用してその活性を調節する他のタンパク質を同定することができる。

【0117】

二ハイブリッド系は殆どの転写因子のモジュラー的性格に基づくものであり、それは、分離可能なDNA結合および活性化ドメインから成っている。簡潔に述べると、この検定は二種の異なるDNA構築物を利用する。例えば、一方の構築物においては、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をコードしているポリヌクレオチドが、既知の転写因子のDNA結合ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる（例えばGAL-4）。別の構築物においては、未同定タンパク質（「餌」または「試料」）をコードしているDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードしているポリヌクレオチドに融合できる。もし「おとり」および「餌」タンパク質がインピボで相互作用してタンパク質依存複合体を形成できたならば、該転写因子のDNA結合および活性化ドメインは極めて近位に招来される。この近位性が、転写因子に応答する転写調節部位と機能的に結合しているリポーター遺伝子（例えばlacZ）の転写を可能にする。リポーター遺伝子の発現が検出でき、機能的転写因子を含む細胞コロニーを単離し、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と相互作用するタンパク質をコードしているDNA配列取得に使用すること

ができる。

【0118】

反応体の一方または両方の非結合型からの結合型の分離を促進するため、そして検定の自動化の便宜を図るため、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固定化することが望ましいかも知れない。したがって、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを固体支持体に結合させることができる。好適な固体支持体は、ガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、微量定量ウェル、管、シリコンチップ、またはビーズ（ラテックス、ポリスチレン、またはガラスビーズを包含するがこれらに限定されない）のような粒子を包含するがこれらに限定されない。共有および非共有結合、受動吸収、またはそれぞれポリペプチド（またはポリヌクレオチド）または被験化合物に付着させた結合部分と固体支持体の対、の使用を包含する、当分野で既知の任意の方法を用いてヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質（またはポリヌクレオチド）または被験化合物を固体支持体に付着させることができる。被験化合物は好ましくは整列して固体支持体に結合させ、その結果個々の被験化合物の位置を追跡することができる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質（またはポリヌクレオチド）への被験化合物の結合は、反応体を入れるのに適した任意の容器で達成できる。かかる容器の例には微量定量プレート、試験管、および微量遠沈管がある。

10

【0119】

一つの態様において、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を固体支持体に結合させる細胞ドメインを含む融合タンパク質である。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, Mo.）上またはグルタチオン誘導体化微量定量プレート上に吸着させ、次いでこれを被験化合物または被験化合物および非吸着ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に合し；次にこの混合物を複合体形成が行われる条件下でインキュベートする（例えば、塩およびpHに関して生理的条件）。インキュベーションの後、ビーズまたは微量定量プレートのウェルを洗浄して未結合成分を除去する。反応体の結合は上記のように直接的または間接的に測定できる。別法として、複合体を固体支持体から解離させた後に結合を測定することもできる。

20

【0120】

さらに固体の支持体中のポリペプチドあるいはポリヌクレオチドを固定するための他の技術は発明の分析の中で使用することができた。例えば、キナーゼ様蛋白質ポリペプチド（あるいはポリヌクレオチド）あるいは試験が合成するスフィンゴシンがそうでありうるかは、ビオチンとストレプトタビジンの利用する結合を固定する。キナーゼ様蛋白質ポリペプチドあるいは試験化合物から準備することができる、ビオチン化されたスフィンゴシン、（例えばbiotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill）において有名な技術を使用し、ストレプトタビジンを施した96ウェルにおいて固定されるビオチン-NHS（N-hydroxysuccinimide）プレート（ピアス・ケミカル）。別法では、抗体、特にスフィンゴシンにキナーゼ様蛋白質ポリペプチド・ポリヌクレチド、あるいは試験化合物を結合させる。しかしそれは活性部位あるいはスフィンゴシンのフィブロネクチン領域のように、拘束力のある部位に干渉をしない、キナーゼ様蛋白質ポリペプチドはプレートのウェルから得られることができる。抗体結合は遊離の目的タンパク質をウェルに閉じ込めることができた。

30

40

【0121】

本発明に係るスクリーニング検定には、タンパク質またはポリヌクレオチドを固体支持体上に固定化するためのその他の技術を使用することもできる。例えば、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質（またはポリヌクレオチド）または被験化合物のいずれかを、ビオチンとストレプトタビジンのコンジュゲーションを利用して固定化できる。当分野で周知の技術（例えばビオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.）を用いて、ビオチニル化したヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク

50

質（またはポリヌクレオチド）または被験化合物をビオチン - N H S（N - ヒドロキシスクシンイミド）から調製し、ストレプトアビジン被覆した96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェルに固定化できる。別法として、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、ポリヌクレオチド、または被験化合物に特異的に結合するが、所望の結合部位、例えばATP/GTP結合部位またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性部位に干渉しない抗体をプレートのウェルに誘導体化することができる。未結合の標的またはタンパク質が抗体コンジュゲーションによりウェル中に捕捉できる。

【0122】

GST - 固定化複合体について上に記載した方法に加え、このような複合体を検出する方法には、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質または被験化合物に特異結合する抗体を用いる、複合体の免疫検出、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性検出へと引き継がれる酵素結合検定、および非還元条件下でのSDSゲル電気泳動がある。

10

【0123】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはポリヌクレオチドに結合する被験化合物を求めるスクリーニングは、無傷の細胞で実施することもできる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはポリヌクレオチドを含む任意の細胞が、細胞に基づく検定系で使用できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドは細胞中に天然に存在し、または上記のような技術を用いて導入できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質またはポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合は、上記のように測定する。

20

【0124】

酵素検定

ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のセリンプロテアーゼ活性を増大または低下細胞能力について、被験化合物を試験できる。セリンプロテアーゼ活性は、例えばLiu et al., 2 : Biol. Chem. 275, 19513-20, 2000に記載のように測定できる。酵素検定は、精製ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、細胞膜調製物または無傷の細胞と、被験化合物とを接触させた後に実施できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のトランスケトラーゼ活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90または100%低下細胞被験化合物を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を低下細胞可能性のある治療物質として同定する。ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質のセリンプロテアーゼ、好ましくはセリンプロテアーゼトリプシン活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90または100%増大細胞被験化合物を、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を増大細胞可能性のある治療物質として同定する。

30

【0125】

遺伝子発現

別の態様では、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子の発現を増大または減少細胞被験化合物を同定する。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、RNAまたはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドのポリペプチド産物の発現を測定する。被験化合物存在下での適当なmRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、該被験化合物不在下でのmRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。すると被験化合物が、この比較に基づく発現のモジュレーターとして同定できる。例えば、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により大きい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現の刺激物質または増強物質と同定する。そうではなく、mRNAまたはポリペプチドの発現が、被験化合物の不在時よりも存在時により小さい場合は、この被験化合物を、該mRNAまたはポリペプチド発現のインヒビターと同定する。

40

【0126】

細胞におけるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質mRNAまたはポリペプチド発現のレベルは、mRNAまたはポリペプチドを検出するための当分野で周知の方法により決

50

定できる。定性または定量的方法のいずれかが使用できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドのポリペプチド産物の存在は、例えばラジオイムノアッセイのような免疫化学的方法、ウエスタンブロッティング、および免疫組織化学を包含する、当分野で周知の様々な技術を用いて決定できる。別法として、ポリペプチド合成は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質内への標識アミノ酸の取り込みを検出することにより、インビボで、細胞培養で、またはインビトロ翻訳系で決定できる。

【0127】

このようなスクリーニングは、無細胞検定系または無傷の細胞のいずれかで実施できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドを発現するいかなる細胞も細胞に基づく検定系で使用できる。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチドは細胞内に天然に存在するか、または上記のような技術を用いて導入することができる。一次培養または確立された細胞系、例えばCHOまたはヒト胚性腎293細胞のいずれかを使用できる。

10

【0128】

医薬組成物

本発明はさらに、治療効果を達成するために患者に投与できる医薬組成物を提供する。本発明に係る医薬組成物は、例えばヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質ポリヌクレオチド、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に特異的に結合する抗体、または類似体、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性のアゴニスト、アンタゴニスト、又はインヒビターを含み得る。この組成物は単独で、または少なくとも1種類の他の物質、例えば安定化化合物と組み合わせて投与でき、これは、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水を包含する（但しこれらに限定されない）任意の無菌で生物学的適合性のある製薬的担体中で投与できる。この組成物は単独で、または他の物質、薬物またはホルモンと組み合わせて患者に投与できる。

20

【0129】

活性成分に加えてこれらの医薬組成物は、賦形剤および補助物質を含む適当な製薬的に許容し得る担体を含有でき、これらは、製薬的に使用できる調製物への活性化化合物の処理を促進する。本発明に係る医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段を包含する（但しこれらに限定されない）多くの経路により投与できる。経口投与用医薬組成物は、当分野で既知の製薬的に許容し得る担体を用いて経口投与に適した用量に調合できる。このような担体により、該医薬組成物を、患者が内服するための錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などに調合できる。

30

【0130】

経口使用のための医薬製剤は、活性化化合物を、固体賦形剤と合し、得られた混合物を所望により粉碎し、そしてこの顆粒混合物を、所望ならば適当な補助物質を加えた後に処理して錠剤または糖衣剤核を得る。好適な賦形剤は炭水化物またはタンパク質増量剤、例えば乳糖、シュクロース、マンニトール、またはソルビトールを包含する糖；トウモロコシ、小麦、米、馬鈴薯、またはその他の植物由来の澱粉；細胞ロース、例えばメチル細胞ロース、ヒドロキシプロピルメチル細胞ロース、またはカルボキシメチル細胞ロースナトリウム；アラビアゴムおよびトラガカントゴムを包含するゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質である。所望により崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加できる。

40

【0131】

糖衣剤核は、濃縮糖溶液のような適当な被覆剤と共に使用でき、これはさらに、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、carboxypolゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含むことができる。産物の同定のためまたは活性化化合物の量、即ち用量をあらわすため

50

に染料または色素を錠剤または糖衣被覆剤に添加できる。

【0132】

経口的に使用できる医薬調合物は、ゼラチン製の押しではめ込むカプセル剤、ならびに、ゼラチンおよび被覆剤、例えばグリセロールまたはソルビトールでできた軟封入カプセル剤を包含する。押しではめ込むカプセル剤は、活性成分を、乳糖または澱粉のような増量剤または結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、および所望により安定剤と混合して含有できる。軟カプセル剤では、活性化合物を、安定剤を加えたまたは加えない適当な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに溶解または懸濁できる。

【0133】

非経口投与に好適な医薬製剤は、水溶液、好ましくは生理学的適合性の緩衝液、例えばハanks溶液、リンゲル溶液、または生理学的に緩衝化した食塩水中で調合できる。水性注射用懸濁剤は、該懸濁液の粘度を増加させる細胞物質、例えばカルボキシメチル細胞ロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有できる。さらに、活性化合物の懸濁剤は適当な油性注射用懸濁剤として調製できる。好適な親油性溶媒または媒質は、胡麻油のような脂肪油、またはオレイン酸エチルまたはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、またはリポソームを包含する。非脂質ポリカチオンアミノポリマーもまた送達に使用できる。所望により懸濁剤は、化合物の溶解性を増し高濃縮溶液の調製を可能にするような適当な安定剤または物質を含むことができる。局所または鼻腔投与のためには、透過すべき特定の障壁に対し適当な浸透剤を製剤に使用する。このような浸透剤は当分野で一般に知られている。

【0134】

本発明に係る医薬組成物は当分野で既知の方法で、例えば常套的混合、溶解、顆粒化、糖衣剤製造、すりつぶし、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥プロセスによって製造できる。この医薬組成物は塩として提供でき、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、琥珀酸などを包含する（但しこれらに限定されない）多くの酸を用いて調製できる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基型よりもより可溶性の傾向がある。別の場合には、好ましい調製物は、pH範囲4.5から5.5において以下のもの：1 - 50 mMヒスチジン、0.1% - 2% シュクロース、および2 - 7% マンニトール、の全てまたは任意のものを含むことができる凍結乾燥粉末であってよく、これを使用前に緩衝液と合する。

【0135】

調合と投与のための技術のさらなる詳細は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa)の最新版に見出すことができる。医薬組成物を製造した後、これらを適当な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベルを貼る。このようなラベル表示は、投与の量、頻度、および投与方法を包含する。

【0136】

治療上の適応および方法

新規のヒトスフィンゴシン、キナーゼ様蛋白質配列、そして具体的なmRNAの5'末端の配列はアンチセンスの核酸生産の中で使用することができた。ヒトスフィンゴシンの過少発現、キナーゼ様蛋白質、そしてヒトスフィンゴシンキナーゼ蛋白質遺伝子の疾病に関連する変化を発見する際に薬ふるい分けで使用用の蛋白質を発現する細胞キナーゼのようなヒトスフィンゴシンを生産するために、配列も宿主細胞へ感染することができる。キナーゼ様蛋白質がそうでありうるヒトスフィンゴシンの調節物質は、試薬として、アレルギー、伝染、外傷あるいは有毒化合物への接触と関係する、あるいは伝染のような疾患、遺伝病、自己免疫疾患、癌、神経組織変成の疾患および心臓血管疾患を治療する。より明確には、ヒトスフィンゴシンは蛋白質を抑制する試薬キナーゼのように、腫瘍増殖および侵入の予防において、および癌細胞アポトーシスの促進において有益である；慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、乾癬および癌のような疾病状態、および心臓病、傷治療および骨

10

20

30

40

50

髄移植中の新しい血液成長の促進の阻止；アテローム性動脈硬化症と喘息のような疾病状態の平滑筋細胞増殖の抑制；虚血の組織傷でのようなストレスへの細胞の反応性の調節；心臓の機能維持；そして炎症性の細胞の組織侵入、活性化およびアポトーシスの抑制。

【0137】

1. アレルギー 蛋白質活性キナーゼのようなスフィンゴシンの調節は、アレルギーを治療する方法を提供する。アレルギー反応の病因の第一歩はアレルゲンに応じて免疫グロブリンE（免疫グロブリンE）抗体の生産である。アレルゲンへの接触に際して、反応する個人のB細胞はアレルゲンに特有の免疫グロブリンE分子を分泌する。免疫グロブリンE分子は、マスト細胞と好塩基性細胞上で存在する高い類似免疫グロブリンE受容体（FcRI）に拘束する。（U.S.特許5,977,072を参照）。

10

【0138】

免疫グロブリンE結合は、アレルギーと炎症性のレスポンスを促進する様々な血管に作用するメディエーターの放出を活性化する。アレルゲン分子をには形成する境界免疫グロブリンE分子によって2つ以上のFcRIsが架橋される場合は常に、活性化が生じます。そのような集合体は、細胞質の小粒および鉛板からプロスタグランジン、ロイコトリエン、サイトカニンおよび過敏反応の他のエフェクターの合成にヒスタミンとプロテアーゼを放出する、生化学のカスケードを開始する。

【0139】

マスト細胞と好塩基性細胞は炎症の部位で蓄積し、活性化に際して、顆粒細胞/マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン-3およびインターロイキン-6のような血液生成成長因子を分泌する。これらの要因は、好中球、マクロファージおよびエオシン好性の細胞のような炎症性の細胞を補充し、活性化することにより、炎症性の反応を広めます。活性化された細胞は、進行中の炎症、腫瘍侵入、血管形成、繊維症および血栓症の領域で蓄積する。FcRIによる細胞の免疫グロブリンE依存の活性化は局所的な組織防御、組織維持および改変へ指図された、炎症性の反応および免疫調節（Gagari, E. et al (1997) Blood 89: 2654-2663)に帰着する。

20

【0140】

FcRIに拘束する免疫グロブリンEは、休止する条件の下での受容体に結合するキナーゼを活性化する。燐酸化された受容体はスフィンゴシン・キナーゼ（それはスフィンゴシン-1-リン酸塩（SPP）の生産を引き起こし、マスト細胞中のカルシウム動員に寄与する）を活性化する。燐酸化された受容体は、さらにリンとSykのようなチロシン・キナーゼ（それらはCが燐酸化したホスホリパーゼを含む細胞質の分子のチロシン燐酸化を引き起こす）を活性化する、ホスホリパーゼC加水分解ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート、またイノシトール1,4,5-トリホスフェートおよびジアシルグリセロールを放出する。後のものは、細胞内と細胞外の出所からのCa²⁺を動員し、蛋白質キナーゼC（Paolini, R. et al. (1991) Nature 353: 855-858; and Beaven, M. A. and Baumgartner, R. A. (1996) Curr. Opin. Immunol. 8: 766-772)を活性化する。

30

【0141】

SPPは、細胞の内部で、および細胞外にEDGファミリー（EDG 1、3、5、6および8）のGPCRのための配位子としてCa²⁺動員、細胞活性化、増殖および存続を調節する別のメッセンジャーの役割をし、種々の生物学の機能を有する。SPPは、スフィンゴシン、セラミダーゼおよびスフィンゴシン・キナーゼの連続する作用によって細胞外の刺激に応じて合成される。多くの細胞系が、両方のの転写と翻訳のレベルにスフィンゴシン・キナーゼ活性が調節されSI.P.生産に重大な役割を果たすことを示した。

40

【0142】

2. スフィンゴシン・キナーゼは、喘息および他の炎症性の疾病の病因において重要であり得る。洗浄流体中のSPPレベルの著しい高台は分節の抗原投与に続く喘息において観察された。SPP（それ自体あるいはPDGFを備えた共同作用の中で）もIL-6生

50

産を調節するために報告された。さらに、スフィンゴシンと S I . P . の間のバランスがマスト細胞の活性化には決定的であることが実証されました、細胞系、スフィンゴシンキナーゼ I がそれらの刺激用の任意のスイッチの役割をするところで、多くの喘息の徴候の開始物質として関係している。

【 0 1 4 3 】

スフィンゴシン・キナーゼ様蛋白質はジアシルグリセロールキナーゼのある点で 2 つの既知のスフィンゴシン・キナーゼと類似しています、スフィンゴシン・キナーゼに D - トレオスフィンゴシンを燐酸化する能力を与えるために推定される、触媒現象の領域。しかしながら、それは、その N - 末端でさらに相同 (P H) 領域を持っている点で、他の 2 つのスフィンゴシン・キナーゼと異なります (下記の図形を参照) 。 P H は蛋白質を示すことで見つかった領域で、イノシトール・リン酸塩、 G 蛋白質のベータ / ガンマサブユニット、蛋白質の燐酸化された S e r / T h r 残留物および薄膜を拘束する能力を含む多数の機能があります。キナーゼ様 3 つのヒトスフィンゴシン・キナーゼ、 S P H K 1、 S P H K 2 およびスフィンゴシン、 3 8 4、 6 1 8 のおよび 5 3 7 アミノ酸の蛋白質をそれぞれコード化する。長さの差に加えて、スフィンゴシン・キナーゼは、さらに組織分配の差を示す。 3 つの、スフィンゴシン、キナーゼ状、ほぼすべての組織で発現し、最も広い分配を持つように見える。しかしながら、顕著に、それが微小血管の内皮の細胞の中で最も高く発現される、ということ細胞系が身体の全体にわたって分かった。これはそのスフィンゴシンをキナーゼ様およびより多くの、したがって、他のスフィンゴシン・キナーゼより、それらの付着分子発現、細胞から細胞の接触、サイトカニンおよび成長因子分泌、増殖および血管形成を調節して、内皮の細胞の活性化に重要な役割を果たしてもよい。

10

20

【 0 1 4 4 】

3 . 癌 癌は、基本的に発癌性細胞形質転換によって発症する疾患である。形質転換細胞をそれらの正常な対応物から区別し、かつ癌の病態生理に基づく形質転換細胞の特徴は幾つかある。それらには、非制御型細胞性増殖、通常死誘導シグナルに対する不応答 (不死化) 、増大した細胞運動性及び侵襲性、新たな血管新生の誘導を通じた血液供給を補充するための増大した能力 (血管新生) 、遺伝子の不安定性、並びに調節不全遺伝子発現が挙げられる。薬剤耐性の獲得とともに、これらの異常な生理機能の種々の組み合わせにより、最終的に臓器不全および患者の死となる難治性疾患状態に頻繁に陥る。

【 0 1 4 5 】

最も一般的な癌治療は、細胞増殖を標的とし、形質転換細胞と正常細胞との間の効率に関するその特異な増殖能に基づいている。このアプローチは、幾つかの重要な正常細胞タイプもまた高増殖であり、かつ癌細胞が高頻度にこれらの物質に対して耐性となるという現実により妨げられている。従って、従来抗癌治療についての治療指数は珍しく 2 . 0 を超えている。

30

【 0 1 4 6 】

ゲノクス誘導性分子の標的特定は、癌患者に安全で、かつより効率的な処置を提供できる治療介入のための新たな癌特異的標的を特定する可能性を開いた。従って、新たに発見される腫瘍関連遺伝子及びその産物を疾患におけるそれらの機能 (群) について試験でき、そして革新的な治療を発見し、かつ開発するために道具として用いることができる。以上に概説した生理学的プロセスの多くに重要な働きがある遺伝子は、癌標的として特徴付けることができる。

40

【 0 1 4 7 】

遺伝子は処置として使用できる。また、ゲノクスを通じて特定される遺伝子又は遺伝子断片は、すぐに 1 つ又はそれ以上の非相同 (ヘテローガス) 発現系において発現させ、機能性組換えタンパク質を産生させることができる。このタンパク質は、その生物学的機能についてインビトロで特徴付けられ、その後その生化学活性の化学修飾因子 (モジュレーター) を特定するため、ハイスループット分子スクリーニングプログラムにおける道具として用いられる。標的タンパク質活性のアゴニスト及び / 又はアンタゴニストをこの様式で特定し、次いで、細胞およびインビボ疾患モデルにて抗癌活性について試験する。生物

50

学的モデルにおける反復試験や、詳細な薬物動態力学的分析及び中毒学的分析を用いたリード化合物の最適化により、薬物開発及び次のヒトでの試験についての基礎を形成する。

【0148】

4. 自己免疫疾患 免疫系の主要な生理学の機能は伝染性の生物の除去である。さらに、保護免疫の原因であるエフェクターメカニズムは宿主組織を害することができた。いくつかの状況で、特定の免疫反応はほとんど保護を有しない。また、有害な結果は支配的である。この最良の例は自己抗原に対する病理学の免疫反応によって引き起こされた自己免疫疾患である。(U. S. Patent No. 6,098,631)。

【0149】

潜在的に有害な免疫反応は、応答性のリンパ細胞を機能的に不活性化するか殺すことによって防御し得る。リンパ細胞応答の抑制に關与する主要な細胞崩壊のメカニズムはFasを媒介としたアプロティックな方法である。 10

【0150】

この方法を使用して、宿主が生き残るように、免疫系は積極的に潜在的に有害な細胞を除去するA. Abbas, "Die and Let Live: Eliminating Dangerous Lymphocytes," Cell 84: 655 (1996) 参照。Fasを媒介とした細胞死の異常は、FasおよびFas配位子がそれら自身正常な状況のさえ自己免疫に帰着するかもしれない。例えば、アポトーシスが禁じられ、増殖道が刺激される場合、活性化されたリンパ細胞は除去を回避し、疾病を引き起こすかもしれない。 20

【0151】

自己免疫疾患の確立している治療は、炎症の最終の共通のあるいは免疫学のメディエーターのいずれかを阻止することを目的とする。両方のアプローチは非特異的で、したがって、筋骨の副作用、同化作用の副作用、神経学と結合組織副作用、免疫抑制、骨髄および胃腸の毒性、肝臓障害、肺疾病、過敏反応、聴覚障害、腎臓部の毒性(皮膚と粘膜の毒性)のような厳しい副作用に關係する。R. Million et al., Lancet 1: 812 (1984), J. A. Engelbrecht et al., Arthritis and Rheumatism 26: 1275 (1983), G. W. Cannon et al., Arthritis and Rheumatism 30: 1269 (1983), Simon and Mills, "Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs," N. Eng. J. Med. 302: 1179 (1980), Katz et al., Ann. Int. Med. 101: 176 (1984), W. F. Kean et al., Arthritis and Rheumatism 23: 158 (1980). 30

【0152】

したがって、自己免疫疾患用の現在の治療は、重大な副作用の高い発生率に關係する。更に、いくつかの薬物治療は徴候的な救済を行うかもしれないが、多くの場合では、それらは著しく共同の破壊のような徴候の進行を修正しない。必要なものはより低い毒性を備えた、治療がよりよくであるそのようなもの、許容された、そして自己免疫疾患の治療に、より適切な有効な治療法である。 40

【0153】

SPPはFasを媒介とした細胞死道を阻止すると示された。O. Cuvillier et al., "Suppression of ceramide-mediated Programmed Cell Death By Sphingosine-1-phosphate," Nature 381: 800 (1996)を参照。したがって、蛋白質活性キナーゼのようなスフィンゴシンの阻止は、SPPの構成を防ぐことによりFas介在のアポトーシスの阻止を逆にする事への実行可能な方法である。SPPはスフィンゴシン・キナーゼの活性によってスフィンゴシンから生産される。SPPの正味の影響はセラミドを媒介とした細胞死の阻止である。したがって、スフィンゴシンの調節、キナー 50

ゼ様蛋白質は、例えば慢性関節リウマチ、全身エリテマトーである、墓の疾病、多発性硬化症（MS）およびタイプのような自己免疫疾患を治療するか防ぐ方法を提供し得る。

【0154】

本発明は、上記のスクリーニング検定によって同定される新規物質の使用にさらに関する。従って、本明細書に記載するように同定される被験化合物を適当な動物モデルに使用することは、本発明の範囲内にある。例えば、本明細書に記載するように同定される物質（例えば、調節物質、アンチセンス核酸分子、特異的な抗体、リボザイム又はヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質結合分子）を、そのような物質を用いた処置の効果、毒性又は副作用を決定するために、動物モデルに用いることがある。あるいは、本明細書に記載するように同定された物質を、該物質の作用機構を決定するために、動物モデルに使用する
10

【0155】

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性に影響を及ぼす試薬を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を低下さ細胞ために、インビトロ又はインビボのいずれかにおいてヒト細胞に投与することができる。試薬は、ヒトヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子の発現産物と結合することが好ましい。その発現産物がタンパク質である場合、試薬は抗体であることが好ましい。エックスピボにおけるヒト細胞の処置については、抗体を、人体から取り出しておいた幹細胞の調製物に添加することができる。その後、その細胞を、当分野で周知のように、クローン増殖さ細胞か、又はさせずに同じ又は別の人体に移すことができる。
20

【0156】

1つの態様においては、試薬を、リポソームを用いて送達する。リポソームは、投与した動物中にて、少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間、さらにより好ましくは少なくとも約24時間安定であることが好ましい。リポソームは、試薬、特にポリヌクレオチドを、動物（例えばヒト）の特定の部位に標的化することができる脂質組成物を含む。リポソームの脂質組成物は、動物の特有の器官、例えば肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、リンパ節及び皮膚を標的化できることが好ましい。

【0157】

本発明に有用なりポソームは、標的化した細胞の原形質膜と融合でき、その内容物を細胞に送達できる脂質組成物を含む。好ましくは、リポソームのトランスフェクション効率は約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $0.5\mu\text{g}$ であり、より好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $1.0\mu\text{g}$ であり、さらにより好ましくは約 10^6 細胞に送達されるリポソーム 16nmol 当たりDNA約 $2.0\mu\text{g}$ である。好ましくは、リポソームは直径が、約 $100\sim 500\text{nm}$ であり、より好ましくは約 $150\sim 450\text{nm}$ であり、さらにより好ましくは約 $200\sim 400\text{nm}$ である。
30

【0158】

本発明に用いるに適したりポソームは、例えば当業者に知られる遺伝子送達法に標準的に用いられるリポソームを含む。より好ましいリポソームは、ポリカチオン脂質組成物を有するリポソームおよび/またはポリエチレングリコールと連結されたコレステロールバックボーン（骨格鎖）を有するリポソームを含む。あるいは、リポソームは特定の細胞タイプを標的化できる化合物、例えばリポソームの外側表面に曝される細胞特異的リガンドを包含する。
40

【0159】

リポソームを、試薬、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムと複合化さ細胞ことは、当分野で標準的な方法（例えば、米国特許 $5,705,151$ を参照のこと）を用いて達成することができる。好ましくは、ポリヌクレオチド約 $0.1\mu\text{g}\sim$ 約 $10\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と複合化する、より好ましくはポリヌクレオチド約 $0.5\mu\text{g}\sim$ 約 $5\mu\text{g}$ をリポソーム約 8nmol と複合化する、さらにより好ましくはポ
50

リヌクレオチド約10 µgをリポソーム約8 nmolと複合化する。

【0160】

別の態様においては、抗体を、受容体媒介性標的化送達を用いて、インビボにて特定の組織に送達することができる。受容体媒介性DNA送達技術は、例えばFindelsら、Trends in Biotechnol. 11, 202-05 (1993); Chiouら、GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J. A. Wolffら、) (1994); Wu & Wu, J. Biol. Chem. 263, 621-24 (1988); Wuら、J. Biol. Chem. 269, 542-46 (1994); Zenkeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3655-59 (1990); Wuら、J. Biol. Chem. 266, 338-42 (1991) にて教示されている。

10

【0161】

試薬が一本鎖の抗体である場合、抗体をコード化するポリヌクレオチドも構築し、細胞へ、ex vivo、あるいは生体内で導入することができる。しかし、トランスフェリン-ポリカチオン化したDNAトランスファー（核酸あるいはカプセルに入れられた核酸を備えたトランスフェクション）は、細胞の融合をリポソーム介在した、DNAを上塗りしたラテックス玉の細胞内の輸送、プロトプラスト融合、ウィルス感染、エレクトロポレーション、「遺伝子銃」DEAE-あるいはリン酸カルシウムを媒介としたトランスフェクション。

20

【0162】

治療的有効量の決定

治療的有効量の決定は、充分当業者の能力の範囲内にある。治療的有効量とは、治療的有効量の不在で起こるヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性に比較してヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性を増大させまたは低下させ細胞活性成分の量を指す。

【0163】

いかなる化合物に関しても、治療的有効量は最初に細胞培養検定で、または動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌ、またはブタで見積もることができる。動物モデルは適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用できる。次にこのような情報を用いてヒトでの有用な用量と投与経路を決定できる。

30

【0164】

治療的有効性および毒性、例えばED₅₀（集団の50%で治療的に有効な用量）およびLD₅₀（集団の50%で致死的な用量）は、細胞培養または実験動物における標準的薬学的方法により決定できる。治療効果に対する毒性効果の用量比が治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。

【0165】

大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養検定および動物研究から得られるデータを、ヒトへの使用のための用量範囲を処方する際に使用する。かかる組成物に含まれる用量は、好ましくは殆どまたは全く毒性を持たないED₅₀を包含する循環濃度の範囲内である。この用量は、使用する用量型、患者の感受性、および投与経路に応じてこの範囲内で変わる。

40

【0166】

正確な用量は、治療を必要とする対象に関連する因子に照らして医師が決定する。用量および投与は、十分なレベルの活性成分を提供するよう、または所望の効果を維持するよう、調節する。考慮できる因子は、疾病状態の重篤度、対象の全身健康状態、年齢、体重、および対象の性別、食餌、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応の感受性、および療法に対する寛容/応答を包含する。長時間作用性医薬組成物は、その製剤の半減期およびクリアランス率に応じて3から4日毎、毎週、または2週間に1回投与することができる。

【0167】

50

標準的な用量は投与経路に応じて0.1から100000マイクログラムまで変えることができ、約1gまでの総用量とすることができる。特定の用量および送達方法についての指針は文献に提供されており、一般に当分野の医師が入手できる。当業者は、ヌクレオチド用にはタンパク質またはそれらのインヒビター用のものとは異なる製剤を使用するであろう。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は特定の細胞、状態、場所などに特異的である。

【0168】

この試薬が一本鎖抗体である場合、この抗体をコードしているポリヌクレオチドを組み立て、トランスフェリン-ポリカチオン-媒介DNA転移、裸のまたはカプセル内核酸を用いるトランスフェクション、リポソームの媒介する細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、電気穿孔、「遺伝子銃」、およびDEAE-または燐酸カルシウム-媒介トランスフェクションを包含する(但しこれらに限定される訳ではない)充分確立した技術を用いて、*ex vivo*またはインビボで細胞内に導入できる。

10

【0169】

抗体の有効なインビボ用量は、約5 μ gから約50 μ g/kg、約50 μ gから約5mg/kg、約100 μ gから約500 μ g/kg(患者の体重)、および約200から約250 μ g/kg(患者の体重)の範囲である。一本鎖抗体をコードしているポリヌクレオチドの投与のためには、有効なインビボ用量は、約100ngから約200ng、500ngから約50mg、約1 μ gから約2mg、約5 μ gから約500 μ g、および約20 μ gから約100 μ gのDNAの範囲である。

20

【0170】

発現産物がmRNAである場合、試薬は好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを発現するポリヌクレオチドは、上記のように多岐にわたる方法によって細胞中に導入できる。

【0171】

好ましくは、試薬は、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子の発現またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を、該試薬の不在時と比較して少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させた細胞。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子の発現レベルまたはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の活性を低下させた細胞よう選択した機構の有効性は、当分野で周知の方法、例えばヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質特異的mRNAへのヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の免疫学的検出、またはヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性の測定を用いて評価できる。

30

【0172】

上記のいずれの態様においても、本発明に係る任意の医薬組成物は他の適当な治療薬と組み合わせて投与できる。併用療法に使用するための適当な物質の選択は、常套的製薬原理に従い、当業者により実施することができる。治療薬の組み合わせは、相乗的に働いて、上記の様々な疾患の治療または予防を奏効させる細胞。このアプローチを用いて、より低い各物質の用量で治療効果を達成することができ、したがって有害な副作用の可能性を低減することができる。

40

【0173】

上記の治療方法のいずれも、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトといった哺乳動物を包含する、このような治療を必要とする任意の対象に適用することができる。

【0174】

本明細書に引用する全ての特許および特許出願は、引用により特に本明細書の一部とする。上記の内容は本発明を一般的に記載するものである。より完全な理解は以下の具体的実施例を参照することによって得られ、それらの実施例は例示のみの目的で提供するもので

50

あり、本発明の範囲を限定する意図は無い。

【0175】

実施例 1

スフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性の検出

配列番号 1 のポリヌクレオチドを発現ベクター pCEV4 に挿入し、得られた発現ベクター pCEV4 - ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質をヒト胎児腎 293 細胞にトランスフェクトする。チオベンジルエステル基質を用いて、トランスフェクト細胞の細胞抽出物のプロテアーゼ活性を測定する。顆粒およびカラムフラクション由来の酵素活性をモニターするため、室温で、0.5 mM 5, 5' - ジチオビス - (2 - ニトロ安息香酸) (DTNB) (Sigma) を用いて検定を行い、HSBzl 脱離基を検出 ($410 = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) する。さらに、マイクロタイター検定 (Green and Shaw, Anal. Biochem. 93, 223 - 226, 1979) を用いて BLT - エラスターゼ活性を見積もる。簡単には、サンプル 50 μL を、10 mM HEPES、1 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 からなる 1 mM DTNB 100 μL 、pH 7.2 に加える。BLT (Sigma) 50 μL を加えて、最終濃度 500 μM にすることによって反応を開始さ細胞。メターゼ (Metase) 測定では、0.1 M HEPES、0.05 M CaCl_2 、pH 7.5 中のサンプル希釈物 50 μL を、1 mM DTNB 100 μL に加え、Boc - Ala - Ala - Met - S ベンジル (Bzl) 50 μL を加え、最終濃度 150 μM にすることによって反応を開始さ細胞。検定の時間は呈色度合いに応じ、その割合 (rate) は Dynatech MR 5000 マイクロプレートリーダーで測定 (O.D._{410}) する。サンプルおよび DTNB のみまたは DTNB および基質のみのコントロールを実行する。

10

20

【0176】

実施例 2

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と結合する被験化合物の同定

グルタチオン - S - トランスフェラーゼタンパク質を含み 96 ウェル マイクロタイタープレートのグルタチオン誘導化ウェルに吸着させた精製ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質を、生理緩衝溶液 pH 7.0 の小分子ライブラリー由来の被験化合物と接触さ細胞。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質は、配列番号 2、10、11 に示すアミノ酸配列を含む。被験化合物は蛍光標識を含む。この試料を 5 分間 ~ 1 時間インキュベートする。コントロール試料は、被験化合物の非存在下にてインキュベートする。

30

【0177】

被験化合物を含む緩衝液を、ウェルから洗い出す。ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質に対する被験化合物の結合を、ウェル内容物の蛍光測定により検出する。被験化合物をインキュベートしていないウェルの蛍光と比較して少なくとも 15% ウェルの蛍光を増大さ細胞被験化合物を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質と結合する化合物と同定する。

【0178】

実施例 3

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子発現を低下さ細胞被験化合物の同定
被験化合物を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質発現構築物でトランスフェクトしたヒト細胞培養に投与し、37 で 10 ~ 45 分間、インキュベートする。トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。RNA を、Chirgwin ら、Biochem. 18, 5294 - 99, 1979 に記載のように 2 つの培養物から単離する。ノーザンブロットを全 RNA 20 ~ 30 μg を用いて調製し、エクスプレスハイブ (Expresshyb) (CLONTECH) 中 65 にて、 ^{32}P - 標識化ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質特異的プローブを用いてハイブリダイズさ細胞。このプローブは配列番号 1 または 9 の相補物より選ばれる少なくとも 11 個の連続ヌクレオチドを包含する。被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較して、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様

40

50

タンパク質特異的シグナルを低下させ細胞被験化合物を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子発現のインヒビターとして同定する。

【0179】

実施例 4

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子発現を低下させ細胞被験化合物の同定
 トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。RNAを、Chirgwinら、Biochem. 18, 5294-99, 1979に記載のように2つの培養物から単離する。ノーザンブロットを全RNA 20~30 µgを用いて調製し、エクスプレスハイブ(Expresshyb)(CLONTECH)中65にて、³²P-標識化ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質特異的プローブを用いてハイブリダイズさせる細胞。このプローブは配列番号1または9の相補物より選ばれる少なくとも11個の連続ヌクレオチドを包含する。被験化合物を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質発現構築物でトランスフェクトしたヒト細胞培養に投与し、37で10~45分間、インキュベートする。トランスフェクトしていない同じタイプの細胞培養を、被験化合物を加えず、同じ時間インキュベートし、ネガティブコントロールとする。RNAを、Chirgwinら、Biochem. 18, 5294-99, 1979に記載のように2つの培養物から単離する。ノーザンブロットを全RNA 20~30 µgを用いて調製し、エクスプレスハイブ(Expresshyb)(CLONTECH)中65にて、³²P-標識化ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質特異的プローブを用いてハイブリダイズさせる細胞。このプローブは配列番号1または9の相補物より選ばれる少なくとも11個の連続ヌクレオチドを包含する。被験化合物の非存在下にて得られるシグナルと比較して、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質特異的シグナルを低下させ細胞被験化合物を、ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子発現のインヒビターとして同定する。

10

20

【0180】

実施例 5

ヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質遺伝子産物と特異的に結合する試薬を用いた乳癌の処置

配列番号1および9の相補物より選択される少なくとも11個の連続ヌクレオチドを含むアンチセンスヒトスフィンゴシンキナーゼ様タンパク質オリゴヌクレオチドの合成は、ホスホラミダイト手順を用いて、ファルマシア ジーン アセンブリー シリーズ シンセサイザー(Pharmacia Gene Assembler series synthesizer)にて実施する(Uhlmannら、Chem. Rev. 90, 534-83, 1990を参照のこと)。アセンブリーおよび脱保護に続き、オリゴヌクレオチドを2度エタノール沈殿させ、乾燥させ、そしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に所望の濃度に懸濁する。これらのオリゴヌクレオチドの純度は、キャピラリーゲル電気泳動及びイオン交換HPLCにより試験する。オリゴヌクレオチド調製のエンドトキシンレベルは、リムルスアメーバ様検定(Limulus Amebocyte Assay)(Bang, Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105, 361-362, 1953)を用いて決定する。

30

40

【0181】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを、患者の乳癌に0.1~100 µmの濃度で直接投与する。患者の乳癌の大きさを数日または数週間の期間で観察する。スフィンゴシンキナーゼ様タンパク質活性の減少のため腫瘍の成長が抑制される。

【0182】

実施例 6

スフィンゴシンキナーゼ様遺伝子産物に特異的に結合する慢性関節リウマチの処理

配列番号1および9は、ホスホロアミダイト法(Uhlmann et al., Chem. Rev. 90, 534-83, 1990)を使用して、Pharmacia遺伝子アセンブラー・シリーズ・シンセサイザー上で実行する。試薬に配列番号の補足から

50

少なくとも11の接触するヌクレオチドを含むキナーゼ様蛋白質オリゴヌクレオチドが選んだ、アンチセンスのスフィンゴシンのキナーゼ様蛋白質遺伝生成物合成を特に結び付ける試薬を備えた。続いて、オリゴヌクレオチドは乾燥し、2度エタノール沈殿され、所望の濃度でリン酸塩バッファーを用いた食塩水(PBS)を中へ留去した。これらのオリゴヌクレオチドの精製はゲルによって試験し、電気泳動にかける、またイオン交換HPLC。オリゴヌクレオチド準備での菌体内毒素レベルはリムルス属変形細胞分析(生物学的な雄牛)を使用して決定した。(Bang, Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105, 361-362, 1953)

【0183】

0.1 - 100 μ mの濃度でアンチセンスのオリゴヌクレオチドを含んでいる水の構成は、針を使用して、患者を処置する。 10

【0184】

慢性関節リウマチアテローム性動脈硬化症の重篤は、膝関節から関節滑液を分泌する流体を取り除き、関節滑液を分泌するT細胞を分離し、T細胞がFasを媒介としたDNA分割に強いかどうか決めることにより、数日か数週の期間の間モニターされる。簡潔に、T細胞は、0.2%のトリトンX-100、pH 8を牽制するTEバッファーの中で溶解されました。破片にされたDNAは、4に20分でmicrofugingすることにより完全な染色質から14,000rpmで遠心した。生じる上澄みは、37に、プロテイナーゼKの1mg/mlで一晩処理し、次に、フェノール/クロロホルム/イソアミールアルコール(25:24:1)で3回抽出した。DNAは、一晩で-20で0.3Mの酢酸ナトリウム、pH 5.2がある状態で、無水エタノールの3回の追加によって促進され、次に、20分で4Cに14,000rpmに遠心分離によってペレット化した。小球は、75%エタノールで2度洗浄し、10を含んでいるTEの30のゲルに溶かした、RNaseのg/ml、一晩、37のCDNAでは、サンプルは1の上の電気泳動によって分離した。エチジウム臭化物がある状態での8%のアガロース・ゲル。アンチセンスのオリゴヌクレオチドの追加の注入は、その時間の間与えることができた。慢性関節リウマチは、蛋白質活性キナーゼのような減少したスフィンゴシンにより抑えられた。 20

【0185】

実施例7

増殖阻止分析：アンチセンスのオリゴヌクレオチドは、癌細胞系の成長を抑えます。試験のために使用された細胞系はヒト結腸癌細胞系HCT116であった。細胞は、多くの0.5mlで1ミリリッター当たり10,000個の細胞の濃度の10-15%の胎児の子牛血清を添加したRPMI-1640において培養し、95%の空気/5%CO₂大気中で37に維持した。 30

【0186】

ホスホロチオエートオリゴリボヌクレオチドはホスホロアミダート化学を使用して、Applied Biosystemsモデル380B DNAシンセサイザー上で合成した。24の基礎のシーケンスは試験・オリゴヌクレオチドとして使用した：(1)5'-TGG TTT CGT AAA TGA CCA TAA ATA-3' (配列番号2、10および11の位置1~24でのヌクレオチドに相補的)。コントロールとして、別の(ランダム)シーケンスを使用した：5'-TCA ACT GAC TAG ATG TAC ATG GAC-3'。オリゴヌクレオチドは2度エタノール沈殿した、乾燥した、またリン酸塩を留去した、バッファーした。オリゴヌクレオチドの精製は、キャピラリーゲル電気泳動およびイオン交換HPLCによって試験した。精製されたオリゴヌクレオチドは、10 μ Mの濃度で培地に加えられた。 40

【0187】

7日の間の試験・オリゴヌクレオチドの追加は、ウェスタンブロッティングにより決定されるような蛋白質キナーゼのようなヒトスフィンゴシンの著しく縮小された発現に帰着した。この結果はコントロール・オリゴヌクレオチドで観察されなかった。3~7日後に、培養細胞中の細胞の数は細胞カウンターを使用して数えた。試験オリゴヌクレオチド(1 50

00%として発現された)で処理した培養細胞中の細胞の数は、対照オリゴヌクレオチドで処理した培養細胞中の細胞の数と比較した。試験オリゴヌクレオチドで処理した培養細胞中の細胞の数は、ヒトスフィンゴシンの阻지가蛋白質キナーゼのように癌細胞に反増殖の効果があることを示して、対照の最高30%であった。

【0188】

実施例 8

発現プロファイルの定量

Higuchiら、1992年、Higuchiら、1993.に記述された、定量的の合成酵素連鎖反応(PCR)分析に最初に基づき、PCRの指数関数的な過程内の所定の、産物の量がテンプレート・コピーの初期の数に比例する。この技術の使用、特別の遺伝子の発現レベル、メッセンジャーRNA(mRNA)として染色体から転写される、mRNAのDNAコピー(cDNA)を最初に作り、次に、cDNA上で量的PCRを実行することにより測定される、量的逆の転写合成酵素連鎖反応(量的RT-PCR)を行った。

10

【0189】

異なるヒト組織からのRNAの定量的のRT-PCR分析は、LBRI-221、スフィンゴシンのキナーゼ様mRNA(配列番号: 2、10および11)の組織分配を調査するために実行した。ほとんどの場合、RT-PCR(ライフ・テクノロジー、ロックヴィル、MD(アメリカ))のSUPERSCRIPT.P.T合成システムを使用して、第1のcDNAを合成するために、様々な組織(ヒトRNAパネルI.V.およびClontech研究所、パロアルト(CA)、アメリカ)からのRNAの合計の25ugをテンプレートとして使用した。第1鎖のcDNA合成は交雑するoligo(dT)を使用して、メーカーのプロトコルによって行なった。3'polyにmRNAのA後部、また合成反応を準備した。その後、第1鎖のcDNAのおよそ10ナノグラムは合成酵素連鎖反応の中でテンプレートとして使用した。他の場合に、商業的に利用可能なcDNAs(ヒト免疫系MTCパネルおよびヒト血液分数MTCパネル、Clontech研究所、パロアルト(CA)、アメリカ)の10ナノグラム、合成酵素連鎖反応の中でテンプレートとして使用した。合成酵素連鎖反応はDNAを拘束力のある蛍光灯染料SYBRグリーンがある状態で、LightCycler(Rocheの分子のBiochemicals、インディアナポリス(IN)、アメリカ)の中で実行した、私、それは二重らせん構造のDNAが反応(モリソン、1998年)でうまく合成されるときに限り生産され、DNA二重らせんの小さな溝に拘束した。二重らせん構造のDNAに拘束する際、SYBRグリーンIは、LightCycler装置によって定量的に測定することができる光を放射した。合成酵素連鎖反応はオリゴヌクレオチドプライマーLBRI221-L3(SEQ ID NO: 12)、および放射された光の強度のLBRI221-R2(SEQ ID NO: 13)および測定を使用して、実行した、反応が放射された光の85のC.強度の温度に達した時反応の各サイクルに続いて、得られた、既知の濃度の同時に反応させられた標準との比較によってテンプレートcDNAの1ナノグラム当たり遺伝子記録のコピー番号に変換した。

20

30

【0190】

様々な組織タイプ中の1個の細胞当たりmRNA転写レベルの差を修正するために、正常化法は、5つの異なる処理を遺伝子の様々な組織の中で同様に計算された発現レベルを使用して実行した:グリ細胞アルデヒド-3-ホスファターゼ(G3PDH)、ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシル転移酵素ART、ベータアクチン、porphobilinogenデアミナーゼ(PBGD)。処理をする遺伝子発現のレベルは、すべての組織(アダムズら、1993年、アダムズら、1995年、Liewら、1994年)のために比較的一定であると考えられ、したがって細胞の相対的な数に接近するゲージとして使用することができた。RNAの合計はcDNA合成ステップの中で使用した。処理をする遺伝子のわずかに異なるセットの使用および発現レベルを測定するLightCyclerシステムの使用を除いて、正常化法は、RNAマスター汚れユーザ・マニュアル、付録

40

50

C (1997年、Clontech研究所、パロアルト(CA)、アメリカ)に記述された方法と同様に行った。すべての組織サンプル中の5つの処理をする遺伝子の発現レベルは、要するに、LightCyclerおよび一定の量のスタートするRNA (25 p.

g)を使用して、1つの遺伝子当たり3つの無所属反応で測定した。既知の濃度の同時に反応させられた標準との比較に由来した各遺伝子の計算されたコピー番号は記録した。また、すべての組織サンプル中の各遺伝子のコピーの中間の番号が決定した。その後、各組織サンプルについては、中間のものに関する各処理遺伝子の発現は計算した。また、5つの処理をする遺伝子上のこれらの値の平均を求めた。その後、各組織の正常化要因は、組織の各々に見合う対応する価値によって標準として任意に選択された組織のうちの1つに見合う最終価値の分割により計算した。組織サンプル中の特別の遺伝子の発現に対する実験的に得られた値を標準化するために、得られた値に試験された組織のための正常化要因を掛けた。ヒト血液分数MTCパネル(それは組織が活性化されたか否かどうかに依存する、いくつかの処理をする遺伝子における劇的な変化を示した)にそれらが由来したこと以外のこの正常化方法は、すべての組織のために使用した。これらの組織では、正常化が、単一の処理遺伝子、ベータ-2-ミクログロブリンで行なった。

10

【0191】

結果は14と15、左側の第1鎖のcDNAの10ナノグラムについてmRNAの実験的に得られたコピー番号を示し、右側上の標準化された値それらのサプライヤーとカタログの番号に加えてcDNA合成のために使用されたRNAは、表および2に示した。

【0192】

20

スフィンゴシン・キナーゼに特に拘束する試薬を備えた喘息の治療

配列番号1および9の相補鎖から少なくとも11の接触するヌクレオチドを含むキナーゼ様蛋白質オリゴヌクレオチドから選択される、アンチセンスのスフィンゴシンの蛋白質遺伝生成物合成: 1と9は、ホスホロアミダート法(Uhlmann et al., Chem. Rev. 90, 534-83, 1990)を使用して、Pharmacia Gene Assemblerシリーズ・シンセサイザー上で実行した。構築と脱保護に続いて、オリゴヌクレオチドは乾燥し、2度エタノール沈殿され、希望の濃度でリン酸塩バッファーを用いた食塩水(PBS)を中へ留去した。これらのオリゴヌクレオチドの精製はキャピラリーゲルによって試験した、電気泳動にかけ、イオン交換HPLC。オリゴヌクレオチド準備での菌体内毒素レベルは、リムルス属変形細胞分析(Bang, Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105, 361-362, 1953)を使用して決定した。

30

【0193】

アンチセンスのオリゴヌクレオチドを含んでいる水性製剤は、吸入によって患者に処置した。

【0194】

喘息の重篤度は徴候の変化に注意する、肺機能を測定する、あるいは洗浄によって肺からサンプリングされた流体の中で多くの炎症性の細胞あるいは炎症性のメディエーターの濃度のような肺炎のマーカーの変化を測定することにより、数日または数週の期間の間モニターした。喘息は、蛋白質活性キナーゼのような減少したスフィンゴシンにより縮小した。

40

【0195】

実施例10

新規化合物の生体内の確認

1. T細胞の活性に対する試験は共刺激分子サイトカニン、サイトカニン受容体、シグナル伝達分子あるいはT細胞活性化に関与する他の分子の発現か活性を調節する試薬を評価するために使用した。

【0196】

マウスはサイトカニン産生モデルを反-CD3-誘導した:

BALB/cハツカラットは、145の2C11(精製ハムスター抗マウスCD3モノク

50

ローナル抗体 (PHARMINGEN) の 10 の A g の単一の静脈注射を注入した。化合物は、反 C D 3 m A b 注入に先立って腹腔内で 60 分処理した。血液は、抗体注入の後に 90 分集めた。血清を 3000 r で遠心分離によって得た。

【 0 1 9 7 】

I L - 2 および I L - 4 のようなサイトカニンあるいは他の分泌された分子の血清レベルは、E L I S A によって決定した。C D 3 の下流のシグナリングを調節する蛋白質はこのモデル中で評価することができた。

【 0 1 9 8 】

2 . B 細胞の活性に対する試験は、B 細胞受容体の発現か活性を調節する試薬、あるいは、B 細胞活性化 / 免疫グロブリンクラス・スイッチングに含まれる他の分子を評価するために使用した。マウス反免疫グロブリン D は免疫グロブリン E 産生モデルを引き起こした。B A L B / c ハツカラットは、精製されたヤギ抗マウス免疫グロブリン D 抗体あるいは P B S (日 0 として定義された) の 0 . 8 m g を静脈内で注入した。化合物は、日 0 ~ 日 6 まで腹腔内で処理した。日に、7 つの血液を集めた。また、血清は 3000 r で遠心分離によって得られた。免疫グロブリン E の合計の血清レベルは Y A M A S A の E L I S A キットによって決定した。また、他の I g サブタイプは I g E L I S A K I T (R o u g i e r B i o - t e c h ' s , M o n t r e a l , C a n a d a) によって測定した。免疫グロブリン D の下流のシグナリングおよび I g クラス・スイッチングを調節する蛋白質は評価することができた。

10

【 0 1 9 9 】

3 . 単球 / マクロファージの活性に対する試験は分子 (転写要因) を示す発現か活性を調節する試薬を評価するために使用した。

20

【 0 2 0 0 】

マウスは T N F a 産生モデルを L P S - 引き起こした :

化合物は腹腔内の注入によって B A L B / c ハツカラットに処理した、そして 1 時間後に、腹腔内の注入によって L P S (200 および u g / マウス) を与えられたハツカラット。L P S 注入およびプラズマが得られた 90 分後、血液が集めた。サンプル中の T N F a 濃度は E L I S A キットを使用して決定した。N F - K B 活性化のような L P S 刺激の影響を下流に調節する蛋白質は評価することができた。

【 0 2 0 1 】

4 . エオシン好性の細胞の活性に対する試験は分子、細胞骨格の分子あるいは付着分子を示して、エオトキシン受容体の発現か活性を調節する試薬を評価するために使用した。

30

【 0 2 0 2 】

マウスは好酸球増加モデルをエオトキシン誘導した :

B A L B / c ハツカラットは、皮内に注入した、6 および 3 日目に 2 . 5 m l のエアポーチを準備するために日 0 において、化合物を腹腔内処理した。また、30 分後に、I L - 5 (300 ナノグラム / マウス) は静脈内投与した。さらに 30 分の後に、エオタキシンは注入した (3 p g / マウス、i d) 。エオタキシン注入の 4 時間後に、a i r p o u c h 浸出物中の白血球を集めた。また、細胞の合計の数が数えられた。浸出物中の差異の細胞数は G r u n w a l d G i m s a により実行した。エオタキシン受容体によってシグナリングを調節するか、エオシン好性の売買を調節する蛋白質は評価することができた。

40

【 0 2 0 3 】

5 . ラットにおける受動皮膚アナフィラキシー (P C A)

6 週齢、のオスの W i s t a r ラットに皮下投与し (i d) 感作し、軽い麻酔下で 0 . 1 の u g / m l マウス反 D N P 免疫グロブリン E 単クローン抗体 (S P E - 7) の 5 0 g l で処理した。24 時間の後に、ラットは、0 . 6 m g の D N P - B S A (30) (L S L C O . L T D) を含有する食塩水の 1 m l およびエヴァンスの 0 . 005 g で静脈内で投与した。化合物は、腹腔内で (i . p .) 注入した。増感、抗原投与および合成の処理のないラットはコントロールとして使用した。また、感作、抗原投与をしたラットは

50

阻止を決定するために使用した。抗原投与の30分後に、ラットを屠殺した。また、後部の皮膚を切除した。皮膚中のエヴァンスの青い染料は、63にて620nmの吸光度でフォルムアミドの中で一晚抽出した、その後、漏らされた染料の光学の密度を得るために測定した。

【0204】

化合物によるPCAの阻害パーセントは以下のように計算した：

$$\% \text{阻害} = \{ (\text{平均媒質容量} - \text{試料容量}) / (\text{平均媒質値} - \text{平均対照値}) \} \times 100$$

ヒスタミン受容体、セロトニン受容体あるいはシステイニルロイコトリエン受容体に対する、マスト細胞顆粒減少、管の浸透性あるいは受容体敵を調節する100の蛋白質を評価することができた。

10

【0205】

6. ラットにおけるアナフィラキシー性気管支収縮

6週齢の雄性WistarラットにSPE-7で静脈内(i.v.)感作し、1日後に、ラットは、ウレタン(1000mg/kg、i.p.)およびガラニン(50mg/kg、i.v.)を添加した麻酔下の1.5mgのDNP-BSA(30)を含んでいる食塩水の0.3mlで静脈内で抗原投与した。カニューレは、人工呼吸(2ml/ストローク、70のストローク/分)のために気管に挿入した。肺の圧力(PI.P.)はカニューレの側面の腕を圧力変換器に接続し、記録した。PI.P.の変化は、抵抗および肺の従順の両方の変化を反映した。化合物を評価するために、化合物を抗原投与の5分前に投与した。

20

【0206】

ヒスタミン受容体、セロトニン受容体あるいはシステイニルロイコトリエン受容体に対する、マスト細胞顆粒減少、管の浸透性あるいは受容体敵を調節する蛋白質は評価することができた。平滑筋の短縮を調節する蛋白質も評価することができた。

【0207】

7. 平滑筋細胞あるいは内皮細胞へのT細胞付着 T細胞の精製した集団は、羊赤血球で惹起し、抗体で覆われた磁気ビーズを使用して、ナイロンウールカラム上で分離した後ficoll密度遠心分離によって製造した。T細胞は36~42時間有系分裂促進物質で活性化した。また、標識を活性化の最後の16時間間で3Hチミジンで付した。気道平滑筋細胞あるいは気管支の微小血管の内皮の細胞は、肺移植組織、癌患者からの気管支切除、死体、あるいは商業的な供給元からの細胞系として得た。新鮮な組織が細胞の源として使用される場合、1.7mMをエチレングリコールで2度30-60分間消化した後、解剖によって平滑筋細胞および内皮の細胞を組織から分離したエチレングリコール-ビス-(ベータ-アミノエチルエーテル)-N,N',N'-四酢酸、640のU/mLコラゲナーゼ、10mg/mLのダイズトリプシン抑制剤および10のU/mLエラスターゼ。平滑筋細胞か内皮の細胞はコンフルエントまで24ウェル組織培養皿において培養した後、24時間TNFαのような試験化合物および炎症性のメディエーターで処理した。付着を測定するために、6つの $\times 10^5$ T細胞を加えられた。37個のC.Nonadherent細胞で1時間付着することが認められ、培地で6回静かに洗うことにより除去した。最後に、残る付着細胞を、PBS中の300 μ Lの1%トリトン-X 100を加えることにより溶解し、シンチレーション計数器で放射能の量を計った。付着細胞/合計から回収された計数值 $\times 100\%$ として結合の百分率を計算した。

30

40

【0208】

表1：全血スクリーニング組織

組織	供給元	パネル名およびカタログ番号
1. 脳	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
2. 心臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
3. 腎臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
4. 肝臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
5. 肺	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
6. 気管	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
7. 骨髄	Clontech	Human Total RNA Panel I I, K4000-1
8. 結腸	Clontech	Human Total RNA Panel I I, K4000-1
9. 小腸	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
10. 脾臓	Clontech	Human Total RNA Panel I I, K4000-1
11. 胃	Clontech	Human Total RNA Panel I I, K4000-1
12. 胸腺	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4000-1
13. 乳腺	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4000-1
14. 前立腺	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4000-1
15. 骨格筋	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4000-1
16. 精巣	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4000-1
17. 子宮	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4000-1
18. 小脳	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4000-1
19. 胎児脳	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4000-1
20. 胎児肝臓	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4000-1
21. 脊髄	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4000-1
22. 胎盤	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4000-1
23. 副腎	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4000-1
24. 膵臓	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4000-1
25. 唾液腺	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4000-1
26. 甲状腺	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4000-1

10

20

【0209】

表2：血液／肺スクリーニング組織

組織	供給元	パネル名およびカタログ番号
1. リンパ節	Clontech	Clontech human Immune System MTC
2. 末梢血白血球	Clontech	Clontech human Immune System MTC
3. 扁桃腺		Clontech human Immune System MTC
4. 末梢血単核球細胞	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
5. 末梢血単核球細胞活性化	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
6. T細胞 (CD8+)	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
7. T細胞 (CD8+) 活性化	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
8. T細胞 (CD4+)	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
9. T細胞 (CD4+) 活性化	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
10. B細胞 (CD19+)	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
11. B細胞 (CD19+) 活性化	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
12. 単球 (CD14+)	Clontech	Clontech Human Blood Fractions MTC
13. Th1クローン	In-house	Human Total RNA Panel I I, K4000-1
14. Th2クローン	In-house	Human Total RNA Panel III, K4000-1
15. 好中球	In-house	Human Total RNA Panel III, K4000-1
16. 好中球	In-house	Human Total RNA Panel III, K4000-1
17. 正常気管支/気管支上皮細胞	In-house	Human Total RNA Panel III, K4000-1
18. 正常気管支/気管支平滑筋細胞	In-house	Human Total RNA Panel III, K4000-1
19. 正常な肺線維芽細胞	In-house	Human Total RNA Panel III, K4000-1
20. 微小血管内皮細胞	In-house	Human Total RNA Panel IV, K4000-1
21. U937	In-house	
22. RAMOS	In-house	
23. Jurkat	In-house	
24. HeLaS3	In-house	
25. IMR-90	In-house	
26. HEK293	In-house	

10

20

30

【0210】

参考文献

1. Liu, et al., J. Biol. Chem., 275: 19513-19520 (2000).
2. BaMruker, T. and E. E. Prieschl, Int. Arch. Allergy Immunol., 122: 85-90 (2000).
3. Takeshita, et al., J. Biol. Chem., M002569200 (2000).
4. Ohta et al., REBS Letters (1994), 355 (3), 267-70.
5. R. Million et al., Lancet 1: 812-816 (1984).
6. J. A Engelbrecht et al., Arthritis and Rheumatism 26 (10): 1275-1278 (1983).
7. G. W. Cannon et al., Arthritis and Rheumatism 50

- ism 26 (10): 1269 - 1274 (1983).
8. Simon and Mills, N. Eng. J. Med. 302 (21): 1179 - 1243 (1980).
9. W. Katz et al., Ann. Int. Med. 101: 176 - 179 (1984).
10. W. F. Kean et al., Arthritis and Rheumatism 23 (2): 158 - 164 (1980).
11. S. Nagata, Advances in Immunology 57: 129 - 144 (1994).
12. R. N. Kolesnick et al., Biochem. Cell Biol. 72: 471 - 474 (1994).
13. M. Verheij et al., Nature 380: 75 - 79 (1996).
14. C. J. van Koppen et al., J Biol. Chem. 271 (4): 2082 - 2087 (1996).
15. O. Cuvillier et al., Nature 381: 800 - 803 (1996).
16. A. Abbas, Cell 84: 655 - 657 (1996).
17. C. Jacob et al., J Immunol 142 (5): 1500 - 1505 (1989).
18. K. Goodemote et al., J. Biol. Chem. 270: 10272 - 10277 (1995).
19. G. H. Fisher et al., Cell 81: 935 - 946 (1995).
20. F. Rieux-Laucat et al., Science 268: 1347 - 1349 (1995).
21. M. Adachi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 1756 - 1760 (1993).
22. B. S. Andrews et al., J. Exp. Med. 148: 1198 - 1215 (1978).
23. H. Takayama et al., Adv. Immunol. 60: 289 - 321 (1995).
24. D. W. Nicholson et al., Nature 376: 37 - 43 (1995).
25. M. Tewari et al., Cell 81: 801 - 869 (1995).
26. A. M. Chinnaiyan et al., Cell 81: 505 - 512 (1995).
27. S. M. Krane and R. T. Salzman, Am J Med. : 75 (4B): 1 - 91 (1983).
28. D. E. Furst, Arth. & Rheum. 37 (1): 1 - 9 (1994).
29. B. O. Barger et al., Arth. & Rheum. 27 (6): 601 - 605 (Jun. 1984).
30. H. B. Stein et al., Ann. Int. Med. 92: 24 - 29 (1980).
31. C. J. Marshall, Nature 367: 686 (1994).
32. G. L'Allemain, Progress in Growth Factor Research 5: 291 - 334 (1994).
33. S. A. Susin et al., J Exp. Med. 186 (1):

25 - 37 (1997).

34. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology* 10: 413 - 417.

35. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BioTechnology* 11: 1026 - 1030.

36. T. B. Morrison, J. J. Weis & C. T. Wittwer. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954 - 962. 10

37. Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fields, C. & Venter, C. (1993) 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. *Nature Genet.* 4: 256 - 265.

38. Adams, M. D., et al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377 suppl: 3 - 174. 20

39. Liew, C. C., Hwang, D. M., Fung, Y. W., Laurenson, C., Cukerman, E., Tsui, S. & Lee, C. Y. (1994) A catalog of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10145 - 10649. 30

【図面の簡単な説明】

【図1】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドのDNA配列（配列番号1）を示す。

【図2】図1のDNA配列の推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図3】EMBL受入れ番号第AF245447号によって同定されるタンパク質のアミノ酸配列（配列番号3）を示す。

【図4】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号4）を示す。

【図5】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号5）を示す。

【図6】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号6）を示す。 40

【図7】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号7）を示す。

【図8】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号8）を示す。

【図9】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号9）を示す。

【図10】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号10）を示す。

【図11】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号11）を示す。 50

1) を示す。

【図12】配列番号3に対するスフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドをコードするDNA配列(配列番号2)のBLASTPアライメントを示す。

【図13】ヒトスフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図14】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチド(配列番号10)全血スクリーニングの発現プロファイルを示す。

【図15】スフィンゴシンキナーゼ様ポリペプチド(配列番号10)血液/肺スクリーニングの発現プロファイルを示す。

【図12】

BLASTP - tremblnew | AF245447 | AF245447 | 1 産物: "スフィンゴシンキナーゼ2型アイソフォーム"; ホモ
 サビエンス スフィンゴシンキナーゼ2型アイソフォーム mRNA, 完全 cds //: gp | AF245447 | 8248285 産物: "ス
 フィンゴシンキナーゼ2型アイソフォーム"; ホモ サビエンス スフィンゴシンキナーゼ2型アイソフォーム mRNA, 完
 全 cds //: gmnew | AF245447 | 8248285 産物: "スフィンゴシンキナーゼ2型アイソフォーム"; ホモ サビエンス
 フィンゴシンキナーゼ2型アイソフォーム mRNA, 完全 cdsに対するスフィンゴシンキナーゼのアライメント

この検索結果を以下にスコア化している: 1 e-17 (期待値) アライメント風(オーバーラップ) 232 同一:
 28 % スコアリングマトリックス: BLOSUM62 (コンセンサスパターンを推測するために用いる) 検索したデータベース:
 ス: nrdb

Q: 1 PKHLLVFNPFEGKGGKRIYERKVAFLFTLASITTDIIGNKFWVYVYEVITEHANOAKE
 P...LLI:NPFGG:G...:V.P.:A.:I TE..N.A:E
 PPRLLLVNPFGRGLAWQWCKNHLVMI SEAGLSFNLIQ-----TERQNHARE

H: 144 TLYEINIKYDGIYCVGGDMFSEVLHGLIGRTQRSAGVDQNHPRALVLPSPSLRIGIIPA
 I...:..:DGIV.V.GDG...EVL:GL:R... AV:P :GI:P
 LVQGLSLSWPDGIVTVSGDGLLHEVINGLLDR-----PDWERAVQMP---VGLLPC
 GSTDCVCYS-----TVGTSDAETSALHIVVGDLSIAMDVSVSHHNSITLLRYSVSLLG
 GS...:..:G...:L...:G...:ID:SV S :S...:..
 GSGNALAGAVNQGGFEPALGDLLMLCSLLCRGGHPDLDLLSVTLASGSRCSFSLVSA
 YGFYGLINDSEKRMGLARIDFSGLKFVLSHHCYGTUFLPAQHTVGGP 223
 N...:..:G...:L...:G...:ID:SV S :S...:..
 WGFVSDVLIQSERPRALGSRFTLGTVGLAHLHYRGRUSYLPATVEPASP 352

シアンルグリセロールキナーゼ触媒ドメインを赤字で示す

【図13】

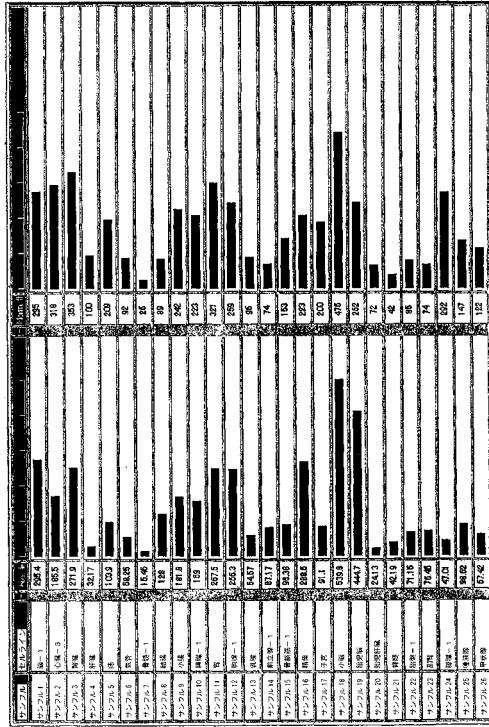
PKHLLVFNPFEGKGGKRI YERKVAFLFT LASITTDIIG NKFWYVYEV ITEHANOAKE
 TLYEINIKDY DGIVCVGGDMFSEVLHGLI GRTQRSAGVD QNHPRALVLP SSLRIGIIPA
 GSTDCVCYST VGTSDAETSA LHIWVGDSIA MDVSVSHNS TLLRYSVSLI GYGFYGLIK
 DSEKRWLGL ARYDFSGLKT FLSHHCYGT VSPFPAQFTV GSPRDKFCR AGCFVCRQSK
 QQLPEEQKKA LYGLEAAEDV EEWVYVCGKF LAINATMNSC ACRSPRGLS PAHLIGDSSS
 DLIILRCSR ENFRLIRH TNQQDQ

シアンルグリセロールキナーゼ触媒ドメインを赤字で示す

Fig. 13

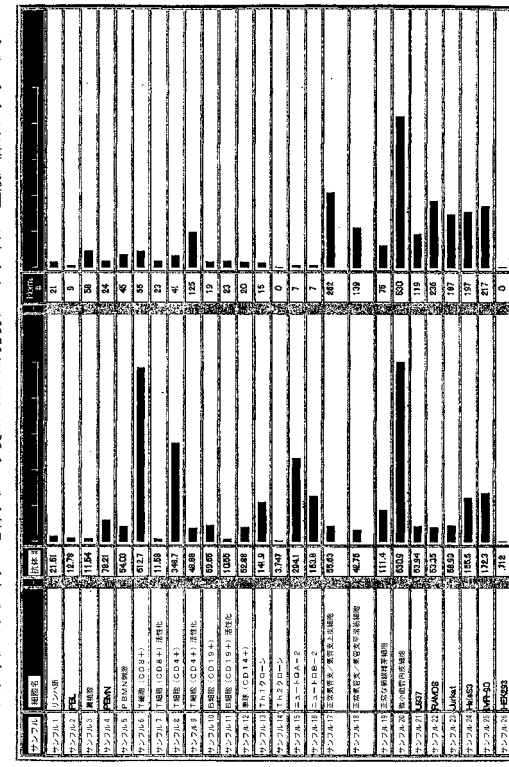
【 図 1 4 】

Fig.14 スフィンゴシンキナーゼ様タンパク質の発現プロファイル



【 図 1 5 】

Fig.15 スフィンゴシンキナーゼ様タンパク質mRNAの発現プロファイル 血液/肺のスクリーニング



【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
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/28906 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 17/00 (81) Designated States (national): 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/EP01/11516 (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, 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, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 5 October 2001 (05.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/238,005 6 October 2000 (06.10.2000) US
60/514,113 23 August 2001 (23.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KOSSIDA, Sophia [GR/FR], 28 Rue des 36 Ponts, F-31400 Toulouse (FR). ENCINAS, Jeffrey [US/JP], 3-17-15, Ayameike-kita, Nara-shi, Nara 631-0032 (JP).
- (74) Common Representative: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).
- 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 02/28906 A2

(54) Title: REGULATION OF HUMAN SPHINGOSINE KINASE-LIKE PROTEIN

(57) Abstract: Reagents which regulate human sphingosine kinase-like protein activity and reagents which bind to human sphingosine kinase-like protein gene products can be used to regulate intracellular signaling and consequently cell proliferation and apoptosis. Such regulation is particularly useful for treating cancer, allergies including but not limited to asthma, autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, and central and peripheral nervous system disorders, such as Parkinson's disease.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 1 -

REGULATION OF HUMAN SPHINGOSINE KINASE-LIKE PROTEIN

5 This application claims the benefit of and incorporates by reference co-pending provisional application Serial No. 60/238,005 filed October 6, 2000.

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

10 The invention relates to the area of regulation of intracellular signaling. More particularly, the invention relates to the regulation of human sphingosine kinase-like protein activity to increase or decrease intracellular signaling.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Sphingosine kinase is found in a wide variety of human tissues, including the lung, liver, spleen, kidney, brain, testis, and hematopoietic system. Sphingosine kinase forms sphingosine-1-phosphate (SPP) from sphingosine. The sphingolipid metabolites, sphingosine, SPP and sphingosylphosphorylcholine (SPC) are emerging as a new class of intracellular second messengers with a wide spectrum of activity in cell
20 growth regulation and signal transduction. It is known that ceramide is an important regulatory participant in programmed cell death (apoptosis) induced by tumor-necrosis factor- β (TNF β) and Fas ligand, members of the TNF superfamily. Conversely, sphingosine and sphingosine-1-phosphate (SPP), which are metabolites of ceramide, induce mitogenesis and have been implicated as second messengers in
25 cellular proliferation induced by platelet-derived growth factor and serum. See U.S. Patent 5,712,262.

SPP prevents the appearance of the key features of apoptosis, namely, intra-nucleosomal DNA fragmentation and morphological changes, which result from
30 increased concentrations of ceramide. Furthermore, inhibition of ceramide-mediated apoptosis by activation of protein kinase C results from stimulation of sphingosine

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 2 -

kinase and the concomitant increase in intracellular sphingosine-1-phosphate. Finally, SPP not only stimulates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway, but also counteracts the ceramide-induced activation of stress-activated protein kinase. Thus, the balance between the intracellular levels of ceramide and SPP and their regulatory effects on different family members of mitogen-activated protein kinases determines the fate of the cell.

Inappropriate sphingosine kinase activity has been implicated in several diseases. For example, elevated levels of SPP are correlated with resistance to apoptosis seen in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis. Decreased levels of SPP are correlated with inhibition of cellular proliferation

Thus, there is a need in the art for identifying new sphingosine kinase-like proteins and methods of regulating intracellular signaling and apoptosis.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the invention to provide reagents and methods of regulating intracellular signaling. These and other objects of the invention are provided by one or more of the embodiments described below.

One embodiment of the invention is a sphingosine kinase-like protein polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 3 -

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;

5 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11; and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11.

10 Yet another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a sphingosine kinase-like protein polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

15 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

20 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;

25 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11; and

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11.

30 Binding between the test compound and the sphingosine kinase-like protein polypeptide is detected. A test compound which binds to the sphingosine kinase-like protein polypeptide is thereby identified as a potential agent for decreasing

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 4 -

extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the activity of the sphingosine kinase-like protein.

5 Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

10 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

15 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9; and

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9.

20 Binding of the test compound to the polynucleotide is detected. A test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation. The agent can work by decreasing the amount of the sphingosine kinase-like protein through interacting with the sphingosine kinase-like protein mRNA.

25 Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which regulate extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a sphingosine kinase-like protein polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 5 -

- amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
- the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
- 5 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;
- the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;
- 10 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11; and
- the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11.
- 15 A sphingosine kinase-like protein activity of the polypeptide is detected. A test compound which increases sphingosine kinase-like protein activity of the polypeptide relative to sphingosine kinase-like protein activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for increasing extracellular matrix degradation. A test compound which decreases sphingosine kinase-like protein activity of the polypeptide relative to sphingosine kinase-like protein activity in the absence of the test compound is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.
- 20
- 25 Even another embodiment of the invention is a method of screening for agents which decrease extracellular matrix degradation. A test compound is contacted with a sphingosine kinase-like protein product of a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- 30 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 6 -

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

5 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9; and

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9.

10 Binding of the test compound to the sphingosine kinase-like protein product is detected. A test compound which binds to the sphingosine kinase-like protein product is thereby identified as a potential agent for decreasing extracellular matrix degradation.

15 Still another embodiment of the invention is a method of reducing extracellular matrix degradation. A cell is contacted with a reagent which specifically binds to a polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide or the product encoded by the polynucleotide, wherein the polynucleotide comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:


20 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1;

25 nucleotide sequences which are at least about 50% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9; and

the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 9.

30 Sphingosine kinase-like protein activity in the cell is thereby decreased.



WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 7 -

The invention thus provides reagents and methods for regulating intracellular signaling which can be used, *inter alia*, to suppress metastatic activity and proliferation of malignant cells and to treat autoimmune diseases, allergies including but not limited to asthma, and central and peripheral nervous system disorders.

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Fig. 1 shows the DNA-sequence encoding a sphingosine kinase-like protein Polypeptide (SEQ ID NO: 1).
- 10 Fig. 2 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig.1 (SEQ ID NO: 2).
- Fig. 3 shows the amino acid sequence of the protein identified by EMBL Accession No. AF245447 (SEQ ID NO: 3).
- 15 Fig. 4 shows the DNA-sequence encoding a sphingosine kinase-like protein Polypeptide (SEQ ID NO: 4).
- 20 Fig. 5 shows the DNA-sequence encoding a sphingosine kinase-like protein Polypeptide (SEQ ID NO: 5).
- Fig. 6 shows the DNA-sequence encoding a sphingosine kinase-like protein Polypeptide (SEQ ID NO: 6).
- 25 Fig. 7 shows the DNA-sequence encoding a sphingosine kinase-like protein Polypeptide (SEQ ID NO: 7).
- Fig. 8 shows the DNA-sequence encoding a sphingosine kinase-like protein Polypeptide (SEQ ID NO: 8).
- 30

7

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 8 -

- Fig. 9 shows the DNA-sequence encoding a sphingosine kinase-like protein Polypeptide (SEQ ID NO: 9).
- 5 Fig. 10 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig. 9 (SEQ ID NO: 10).
- Fig. 11 shows the amino acid sequence deduced from the DNA-sequence of Fig. 9 (SEQ ID NO: 11)
- 10 Fig. 12 shows the BLASTP alignment of human sphingosine kinase-like protein (SEQ ID NO: 2) against SEQ ID NO: 3.
- Fig. 13 shows the amino acid sequence of human sphingosine kinase-like protein polypeptide.
- 15 Fig. 14 shows the expression profiling of sphingosine kinase-like protein polypeptide (SEQ ID NO: 10) whole body screen.
- 20 Fig. 15 shows the expression profiling of sphingosine kinase-like protein polypeptide (SEQ ID NO: 10), blood/lung screen.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention relates to an isolated polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide and being selected from the group consisting of:

- a) a polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- 30 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 9 -

- the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
amino acid sequences which are at least about 50% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;
5 amino acid sequences which are at least about 50% identical to
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11; and
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11;
- b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NOS: 1 or 9;
- 10 c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b);
- d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide
15 sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code;
and
- e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of
a polynucleotide sequence specified in (a) to (d).
- 20

Furthermore, it has been discovered by the present applicant that a novel protein,
particularly a human sphingosine kinase-like protein is a discovery of the present
invention. Human sphingosine kinase-like protein as shown in SEQ ID NO: 2 is
28% identical over 232 amino acids to the *Homo sapiens* protein identified by EMBL
25 Accession No. AF245447 (SEQ ID NO: 3) and annotated as a putative amine oxidase
(Fig. 12). Human sphingosine kinase-like protein contains a diacylglycerol kinase
domain which is shown in bold in Fig. 13.

A coding sequence for SEQ ID NO: 2 is shown in SEQ ID NO: 1. A coding
30 sequence for SEQ ID NOS: 10 and 11 is shown in SEQ ID NO: 9. Related ESTs

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 10 -

(SEQ ID NOS: 4-8) are expressed in germinal center B lymphocytes, T-lymphocytes, embryonic tissue, neuroblastomas, liver, ovary, brain, and kidney.

Human sphingosine kinase-like protein is expected to be useful for the same purposes as previously identified sphingosine kinase (*see Liu, et al., J. Biol. Chem.* 275, 19513-20, 2000). Regulators of a human sphingosine kinase-like protein can be used to regulate intracellular signaling. Human sphingosine kinase-like protein is expected to be especially useful for treating cancer, allergies including but not limited to asthma, central and peripheral nervous system disorders, and autoimmune disease.

Polypeptides

Sphingosine kinase-like protein polypeptides according to the invention comprise an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2, a portion of SEQ ID NO: 2 comprising at least 6, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 320, or 326 contiguous amino acids, or a biologically active variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, as defined below. Sphingosine kinase-like protein polypeptides according to the invention comprise an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 10, a portion of SEQ ID NO: 10 comprising at least 6, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, or 537 contiguous amino acids, or a biologically active variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10, as defined below. Sphingosine kinase-like protein polypeptides according to the invention comprise an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 11, a portion of SEQ ID NO: 11 comprising at least 6, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, or 562 contiguous amino acids, or a biologically active variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11, as defined below. A sphingosine kinase-like protein polypeptide of the invention therefore can be a portion of a sphingosine kinase-like protein molecule, a full-length

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 11 -

sphingosine kinase-like protein molecule, or a fusion protein comprising all or a portion of a sphingosine kinase-like protein molecule.

Biologically Active Variants

5

Sphingosine kinase-like protein variants which are biologically active, *i.e.*, retain a sphingosine kinase-like protein activity, also are sphingosine kinase-like protein polypeptides. Preferably, naturally or non-naturally occurring sphingosine kinase-like protein variants have amino acid sequences which are at least about 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. Percent identity between a putative sphingosine kinase-like protein variant and an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 is determined using the Blast2 alignment program.

10

15

Variations in percent identity can be due, for example, to amino acid substitutions, insertions, or deletions. Amino acid substitutions are defined as one for one amino acid replacements. They are conservative in nature when the substituted amino acid has similar structural and/or chemical properties. Examples of conservative replacements are substitution of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine.

20

Amino acid insertions or deletions are changes to or within an amino acid sequence. They typically fall in the range of about 1 to 5 amino acids. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity can be found using computer programs well known in the art, such as DNASTAR software. Whether an amino acid change results in a biologically active sphingosine kinase-like protein polypeptide can readily be determined by assaying for sphingosine kinase activity, as is known in the art and described, for example, in Liu, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 19513-19520, 2000.

25

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 12 -

Fusion Proteins

Fusion proteins are useful for generating antibodies against sphingosine kinase-like protein amino acid sequences and for use in various assay systems. For example, fusion proteins can be used to identify proteins which interact with portions of a sphingosine kinase-like protein polypeptide, including its active site and fibronectin domains. Methods such as protein affinity chromatography or library-based assays for protein-protein interactions, such as the yeast two-hybrid or phage display systems, can be used for this purpose. Such methods are well known in the art and also can be used as drug screens.

A sphingosine kinase-like protein fusion protein comprises two protein segments fused together by means of a peptide bond. Contiguous amino acids for use in a fusion protein can be selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2 or from a biologically active variants of those sequences, such as those described above. For example, the first protein segment can comprise at least 6, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, or 340 or more contiguous amino acids of SEQ ID NO: 2 or a biologically active variant. Sphingosine kinase-like protein polypeptides according to the invention comprise an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 10, a portion of SEQ ID NO: 10 comprising at least 6, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, or 537 contiguous amino acids, or a biologically active variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10, as defined above. Sphingosine kinase-like protein polypeptides according to the invention comprise an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 11, a portion of SEQ ID NO: 11 comprising at least 6, 10, 15, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, or 562 contiguous amino acids, or a biologically active variant of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11, as defined above. Preferably, a fusion protein comprises the active site of the protease and/or one or both of the fibronectin domains. The first protein segment also can comprise full-length sphingosine kinase-like protein.

The second protein segment can be a full-length protein or a protein fragment or polypeptide. Proteins commonly used in fusion protein construction include β -galactosidase, β -glucuronidase, green fluorescent protein (GFP), autofluorescent proteins, including blue fluorescent protein (BFP), glutathione-S-transferase (GST), luciferase, horseradish peroxidase (HRP), and chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Additionally, epitope tags are used in fusion protein constructions, including histidine (His) tags, FLAG tags, influenza hemagglutinin (HA) tags, Myc tags, VSV-G tags, and thioredoxin (Trx) tags. Other fusion constructions can include maltose binding protein (MBP), S-tag, Lex a DNA binding domain (DBD) fusions, GAL4 DNA binding domain fusions, and herpes simplex virus (HSV) BP16 protein fusions. A fusion protein also can be engineered to contain a cleavage site located between the sphingosine kinase-like protein polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the sphingosine kinase-like protein polypeptide can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

A fusion protein can be synthesized chemically, as is known in the art. Preferably, a fusion protein is produced by covalently linking two protein segments or by standard procedures in the art of molecular biology. Recombinant DNA methods can be used to prepare fusion proteins, for example, by making a DNA construct which comprises sphingosine kinase-like protein coding sequences disclosed herein in proper reading frame with nucleotides encoding the second protein segment and expressing the DNA construct in a host cell, as is known in the art. Many kits for constructing fusion proteins are available from companies such as Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), and Quantum Biotechnologies (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

Identification of Species Homologs

Species homologs of human sphingosine kinase-like protein can be obtained using sphingosine kinase-like protein polynucleotides (described below) to make suitable probes or primers to screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast, identifying cDNAs which encode homologs of sphingosine kinase-like protein, and expressing the cDNAs as is known in the art.

Polynucleotides

A sphingosine kinase-like protein polynucleotide can be single- or double-stranded and comprises a coding sequence or the complement of a coding sequence for a sphingosine kinase-like protein polypeptide. A partial coding sequence of a sphingosine kinase-like protein polynucleotide is shown in SEQ ID NOS: 1 and 9.

Degenerate nucleotide sequences encoding human sphingosine kinase-like protein polypeptides, as well as homologous nucleotide sequences which are at least about 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to the sphingosine kinase-like protein coding sequences nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 also are sphingosine kinase-like protein polynucleotides. Percent sequence identity between the sequences of two polynucleotides is determined using computer programs such as ALIGN which employ the FASTA algorithm, using an affine gap search with a gap open penalty of -12 and a gap extension penalty of -2. Complementary DNA (cDNA) molecules, species homologs, and variants of sphingosine kinase-like protein polynucleotides which encode biologically active sphingosine kinase-like protein polypeptides also are sphingosine kinase-like protein polynucleotides.

Identification of Variants and Homologs

Variants and homologs of the sphingosine kinase-like protein polynucleotides disclosed above also are sphingosine kinase-like protein polynucleotides. Typically, homologous sphingosine kinase-like protein polynucleotide sequences can be identified by hybridization of candidate polynucleotides to known sphingosine kinase-like protein polynucleotides under stringent conditions, as is known in the art. For example, using the following wash conditions--2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, room temperature twice, 30 minutes each; then 2X SSC, 0.1% SDS, 50°C once, 30 minutes; then 2X SSC, room temperature twice, 10 minutes each--homologous sequences can be identified which contain at most about 25-30% basepair mismatches. More preferably, homologous nucleic acid strands contain 15-25% basepair mismatches, even more preferably 5-15% basepair mismatches.

Species homologs of the sphingosine kinase-like protein polynucleotides disclosed herein can be identified by making suitable probes or primers and screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast. Human variants of sphingosine kinase-like protein polynucleotides can be identified, for example, by screening human cDNA expression libraries. It is well known that the T_m of a double-stranded DNA decreases by 1-1.5°C with every 1% decrease in homology (Bonner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 81, 123 (1973)). Variants of human sphingosine kinase-like protein polynucleotides or sphingosine kinase-like protein polynucleotides of other species can therefore be identified, for example, by hybridizing a putative homologous sphingosine kinase-like protein polynucleotide with a polynucleotide having a nucleotide sequence of SEQ ID NOS: 1 and 9. The melting temperature of the test hybrid is compared with the melting temperature of a hybrid comprising sphingosine kinase-like protein polynucleotides having perfectly complementary nucleotide sequences, and the number or percent of basepair mismatches within the test hybrid is calculated.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 16 -

Nucleotide sequences which hybridize to sphingosine kinase-like protein polynucleotides or their complements following stringent hybridization and/or wash conditions are also sphingosine kinase-like protein polynucleotides. Stringent wash conditions are well known and understood in the art and are disclosed, for example, in Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2d ed., 1989, at pages 9.50-9.51.

Typically, for stringent hybridization conditions a combination of temperature and salt concentration should be chosen that is approximately 12-20°C below the calculated T_m of the hybrid under study. The T_m of a hybrid between a sphingosine kinase-like protein polynucleotide having a coding sequence disclosed herein and a polynucleotide sequence which is at least about 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to that nucleotide sequence can be calculated, for example, using the equation of Bolton and McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%\text{formamide}) - 600/l,$$

where l = the length of the hybrid in basepairs.

Stringent wash conditions include, for example, 4X SSC at 65°C, or 50% formamide, 4X SSC at 42°C, or 0.5X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Highly stringent wash conditions include, for example, 0.2X SSC at 65°C.

Preparation of Polynucleotides

A naturally occurring sphingosine kinase-like protein polynucleotide can be isolated free of other cellular components such as membrane components, proteins, and lipids. Polynucleotides can be made by a cell and isolated using standard nucleic acid purification techniques, synthesized using an amplification technique, such as the polymerase chain reaction (PCR), or synthesized using an automatic synthesizer. Methods for isolating polynucleotides are routine and are known in the art. Any such

5 technique for obtaining a polynucleotide can be used to obtain isolated sphingosine kinase-like protein polynucleotides. For example, restriction enzymes and probes can be used to isolate polynucleotide fragments which comprise sphingosine kinase-like protein nucleotide sequences. Isolated polynucleotides are in preparations which are free or at least 70, 80, or 90% free of other molecules.

10 Sphingosine kinase-like protein cDNA molecules can be made with standard molecular biology techniques, using sphingosine kinase-like protein mRNA as a template. Sphingosine kinase-like protein cDNA molecules can thereafter be replicated using molecular biology techniques known in the art and disclosed in manuals such as Sambrook *et al.* (1989). An amplification technique, such as PCR, can be used to obtain additional copies of sphingosine kinase-like protein polynucleotides, using either human genomic DNA or cDNA as a template.

15 Alternatively, synthetic chemistry techniques can be used to synthesize sphingosine kinase-like protein polynucleotides. The degeneracy of the genetic code allows alternate nucleotide sequences to be synthesized which will encode a sphingosine kinase-like protein polypeptide having, for example, the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 10, and 11 or a biologically active variant of that sequence.

20

Obtaining Full-Length Polynucleotides

The partial sequence of SEQ ID NOS: 1 and 9 or its complement can be used to identify the corresponding full length gene from which it was derived. The partial sequences can be nick-translated or end-labeled with ³²P using polynucleotide kinase using labeling methods known to those with skill in the art (BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis *et al.*, eds., Elsevier Press, N.Y., 1986). A lambda library prepared from human tissue can be directly screened with the labeled sequences of interest or the library can be converted en masse to pBluescript (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037) to facilitate bacterial colony screening (see Sambrook *et al.*, 1989, pg. 1.20).

25

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 18 -

Both methods are well known in the art. Briefly, filters with bacterial colonies containing the library in pBluescript or bacterial lawns containing lambda plaques are denatured, and the DNA is fixed to the filters. The filters are hybridized with the labeled probe using hybridization conditions described by Davis *et al.*, 1986. The partial sequences, cloned into lambda or pBluescript, can be used as positive controls to assess background binding and to adjust the hybridization and washing stringencies necessary for accurate clone identification. The resulting autoradiograms are compared to duplicate plates of colonies or plaques; each exposed spot corresponds to a positive colony or plaque. The colonies or plaques are selected and expanded, and the DNA is isolated from the colonies for further analysis and sequencing.

Positive cDNA clones are analyzed to determine the amount of additional sequence they contain using PCR with one primer from the partial sequence and the other primer from the vector. Clones with a larger vector-insert PCR product than the original partial sequence are analyzed by restriction digestion and DNA sequencing to determine whether they contain an insert of the same size or similar as the mRNA size determined from Northern blot Analysis.

Once one or more overlapping cDNA clones are identified, the complete sequence of the clones can be determined, for example after exonuclease III digestion (McCombie *et al.*, *Methods* 3, 33-40, 1991). A series of deletion clones are generated, each of which is sequenced. The resulting overlapping sequences are assembled into a single contiguous sequence of high redundancy (usually three to five overlapping sequences at each nucleotide position), resulting in a highly accurate final sequence.

Various PCR-based methods can be used to extend the nucleic acid sequences encoding the disclosed portions of human sphingosine kinase-like protein to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example,

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 19 -

restriction-site PCR uses universal primers to retrieve unknown sequence adjacent to a known locus (Sarkar, *PCR Methods Applic. 2*, 318-322, 1993). Genomic DNA is first amplified in the presence of a primer to a linker sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

Inverse PCR also can be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res. 16*, 8186, 1988). Primers can be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), to be 22-30 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68 - 72°C. The method uses several restriction enzymes to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

Another method which can be used is capture PCR, which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast artificial chromosome DNA (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic. 1*, 111-119, 1991). In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations are used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown fragment of the DNA molecule before performing PCR.

Another method which can be used to retrieve unknown sequences is that of Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res. 19*, 3055-3060, 1991. Additionally, PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) can be used to walk genomic DNA. This process avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

30

When screening for full-length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. Also, random-primed libraries are preferable, in that they will contain more sequences which contain the 5' regions of genes. Use of a randomly primed library may be especially preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries can be useful for extension of sequence into 5' non-transcribed regulatory regions.

Commercially available capillary electrophoresis systems can be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of PCR or sequencing products. For example, capillary sequencing can employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different fluorescent dyes (one for each nucleotide) which are laser activated, and detection of the emitted wavelengths by a charge coupled device camera. Output/light intensity can be converted to electrical signal using appropriate software (e.g. GENOTYPER and Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), and the entire process from loading of samples to computer analysis and electronic data display can be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for the sequencing of small pieces of DNA which might be present in limited amounts in a particular sample.

20 Obtaining Polypeptides

Sphingosine kinase-like protein polypeptides can be obtained, for example, by purification from human cells, by expression of sphingosine kinase-like protein polynucleotides, or by direct chemical synthesis.

25 Protein Purification

Sphingosine kinase-like protein polypeptides can be purified from human cells, such as primary tumor cells, metastatic cells, or cancer cell lines (e.g., colon cancer cell lines HCT116, DLD1, HT29, Caco2, SW837, SW480, and RKO, breast cancer cell lines 21-PT, 21-MT, MDA-468, SK-BR3, and BT-474, the A549 lung cancer cell

line, or the H392 glioblastoma cell line). Carcinoma of the lung is an especially useful source of sphingosine kinase-like protein polypeptides. A purified sphingosine kinase-like protein polypeptide is separated from other compounds which normally associate with the sphingosine kinase-like protein polypeptide in the cell, such as certain proteins, carbohydrates, or lipids, using methods well-known in the art. Such methods include, but are not limited to, size exclusion chromatography, ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and preparative gel electrophoresis. A preparation of purified sphingosine kinase-like protein polypeptides is at least 80% pure; preferably, the preparations are 90%, 95%, or 99% pure. Purity of the preparations can be assessed by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Enzymatic activity of the purified preparations can be assayed, for example, as described in Lin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274, 18231-36, 1999.

15 Expression of Polynucleotides

To express a sphingosine kinase-like protein polypeptide, a sphingosine kinase-like protein polynucleotide can be inserted into an expression vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding sphingosine kinase-like protein polypeptides and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described, for example, in Sambrook *et al.* (1989) and Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

A variety of expression vector/host systems can be utilized to contain and express sequences encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide. These include, but are not limited to, microorganisms, such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 22 -

5 transformed with yeast expression vectors, insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus), plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids), or animal cell systems.

10 The control elements or regulatory sequences are those non-translated regions of the vector -- enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions -- which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements can vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, LaJolla, Calif) or pSPORT1 plasmid (Life Technologies) and the like can be used. The baculovirus polyhedrin promoter can be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the genomes of plant cells (e.g., heat shock, RUBISCO, and storage protein genes) or from plant viruses (e.g., viral promoters or leader sequences) can be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferable. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of a nucleotide sequence encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

25 Bacterial and Yeast Expression Systems

In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the sphingosine kinase-like protein polypeptide. For example, when a large quantity of a sphingosine kinase-like protein polypeptide is needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified can be used. Such vectors include, but are not limited to, multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as

30

BLUESCRIPT (Stratagene), in which the sequence encoding the sphingosine kinase-like protein polypeptide can be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase so that a hybrid protein is produced. pIN vectors (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) or pGEX vectors (Promega, Madison, Wis.) can be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems can be designed to include heparin, thrombin, or Factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH can be used. For reviews, see Ausubel *et al.* (1989) and Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987.

Plant and Insect Expression Systems

If plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding sphingosine kinase-like protein polypeptides can be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu *EMBO J.* 6, 307-311, 1987). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters can be used (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or by pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (see, for example, Hobbs or Murray, in MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, 1992).

An insect system also can be used to express a sphingosine kinase-like protein polypeptide. For example, in one such system *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. Sequences encoding sphingosine kinase-like protein polypeptides can be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of sphingosine kinase-like protein polypeptides will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses can then be used to infect, for example, *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which sphingosine kinase-like protein polypeptides can be expressed (Engelhard *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

Mammalian Expression Systems

A number of viral-based expression systems can be utilized in mammalian host cells. For example, if an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding sphingosine kinase-like protein polypeptides can be ligated into an adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome can be used to obtain a viable virus which is capable of expressing a sphingosine kinase-like protein polypeptide in infected host cells (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3655-3659, 1984). In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, can be used to increase expression in mammalian host cells.

Human artificial chromosomes (HACs) also can be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid. HACs of 6M to 10M are constructed and delivered to cells via conventional delivery methods (*e.g.*, liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles).

Specific initiation signals also can be used to achieve more efficient translation of sequences encoding sphingosine kinase-like protein polypeptides. Such signals

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 25 -

include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals (including the ATG initiation codon) should be provided. The initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression can be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used (see Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).

Host Cells

A host cell strain can be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process an expressed sphingosine kinase-like protein polypeptide in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the polypeptide also can be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (*e.g.*, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38), are available from the American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

Stable expression is preferred for long-term, high-yield production of recombinant proteins. For example, cell lines which stably express sphingosine kinase-like protein polypeptides can be transformed using expression vectors which can contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 26 -

marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells can be allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium before they are switched to a selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which
5 successfully express the introduced sphingosine kinase-like protein sequences. Resistant clones of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems can be used to recover transformed cell lines.
10 These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980). Genes which can be employed in *tk* or *aprt* cells, respectively. Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate (Wigler
15 *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980); *npt* confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981); and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murray, 1992 *supra*). Additional selectable genes
20 have been described, for example *trpB*, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Visible markers such as anthocyanins, β -glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its
25 substrate luciferin, can be used to identify transformants and to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

Detecting Expression of Polypeptides

Although the presence of marker gene expression suggests that the sphingosine
30 kinase-like protein polynucleotide is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if a sequence encoding a sphingosine kinase-like

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 27 -

protein polypeptide is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences which encode a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the sphingosine kinase-like protein polynucleotide.

Alternatively, host cells which contain a sphingosine kinase-like protein polynucleotide and which express a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein.

The presence of a polynucleotide sequence encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or fragments or fragments of polynucleotides encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides selected from sequences encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide to detect transformants which contain a sphingosine kinase-like protein polynucleotide.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of a sphingosine kinase-like protein polypeptide, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the polypeptide, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay using monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be used, or a competitive binding assay can be employed.

These and other assays are described in Hampton *et al.*, SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) and Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983).

5 A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding sphingosine kinase-like protein polypeptides include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled
10 nucleotide. Alternatively, sequences encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of labeled nucleotides and an appropriate
15 RNA polymerase, such as T7, T3, or SP6. These procedures can be conducted using a variety of commercially available kits (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, and US Biochemical). Suitable reporter molecules or labels which can be used for ease of detection include radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

20

Expression and Purification of Polypeptides

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be cultured under conditions suitable for the expression and
25 recovery of the protein from cell culture. The polypeptide produced by a transformed cell can be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode sphingosine kinase-like protein polypeptides can be designed to contain signal sequences which direct secretion of
30 sphingosine kinase-like protein polypeptides through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

Other constructions can be used to join a sequence encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide to a nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). The inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor Xa or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and the sphingosine kinase-like protein polypeptide can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing a sphingosine kinase-like protein polypeptide and 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification on IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography as described in Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the sphingosine kinase-like protein polypeptide from the fusion protein. Vectors which contain fusion proteins are disclosed in Kroll *et al.*, *DNA Cell Biol.* 12, 441-453, 1993).

20

Chemical Synthesis

Sequences encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.* *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980). Alternatively, a sphingosine kinase-like protein polypeptide itself can be produced using chemical methods to synthesize its amino acid sequence. For example, sphingosine kinase-like protein polypeptides can be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). Protein synthesis can be performed using manual techniques or by automation.

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 30 -

Automated synthesis can be achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Various fragments of sphingosine kinase-like protein polypeptides can be separately synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length molecule.

5

The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (*e.g.*, Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The composition of a synthetic sphingosine kinase-like protein polypeptide can be confirmed by amino acid analysis or sequencing (*e.g.*, the Edman degradation procedure; *see* Creighton, *supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the sphingosine kinase-like protein polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a fusion protein.

10
15

Production of Altered Polypeptides

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce sphingosine kinase-like protein polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

20
25

The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter sphingosine kinase-like protein polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including modification of the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed

30

mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

Antibodies

5

Any type of antibody known in the art can be generated to bind specifically to an epitope of a sphingosine kinase-like protein polypeptide. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab)₂, and Fv, which are capable of binding an epitope of a sphingosine kinase-like protein polypeptide. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more, e.g., at least 15, 25, or 50 amino acids.

10

An antibody which specifically binds to an epitope of a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be used therapeutically, as well as in immunochemical assays, including but not limited to Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art. Various immunoassays can be used to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between an immunogen and an antibody which specifically binds to the immunogen.

15

20

Typically, an antibody which specifically binds to a sphingosine kinase-like protein polypeptide provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies which specifically bind to sphingosine kinase-like protein polypeptides do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate a sphingosine kinase-like protein polypeptide from solution.

25

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 32 -

Sphingosine kinase-like protein polypeptides can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human, to produce polyclonal antibodies. If desired, a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g. lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

Monoclonal antibodies which specifically bind to a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452-454, 1985). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in therapy or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 33 -

residues or by grating of entire complementarity determining regions. Alternatively, one can produce humanized antibodies using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies which specifically bind to a sphingosine kinase-like protein polypeptide can contain antigen binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. 5,565,332.

Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies which specifically bind to sphingosine kinase-like protein polypeptides. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

Single-chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Single-chain antibodies can be mono- or bispecific, and can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bispecific single-chain antibodies is taught, for example, in Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is taught in Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence, as described below. Alternatively, single-chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage technology. Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91.

Antibodies which specifically bind to sphingosine kinase-like protein polypeptides also can be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 34 -

by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

5 Other types of antibodies can be constructed and used therapeutically in methods of the invention. For example, chimeric antibodies can be constructed as disclosed in WO 93/03151. Binding proteins which are derived from immunoglobulins and which are multivalent and multispecific, such as the "diabodies" described in WO 94/13804, also can be prepared.

10

Antibodies of the invention can be purified by methods well known in the art. For example, antibodies can be affinity purified by passage over a column to which a sphingosine kinase-like protein polypeptide is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

15

Antisense Oligonucleotides

Antisense oligonucleotides are nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. Once introduced into a cell, the complementary
20 nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form complexes and block either transcription or translation. Preferably, an antisense oligonucleotide is at least 11 nucleotides in length, but can be at least 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 or more nucleotides long. Longer sequences also can be used. Antisense oligonucleotide molecules can be provided in a DNA construct and introduced into a
25 cell as described above to decrease the level of sphingosine kinase-like protein gene products in the cell.

Antisense oligonucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or a combination of both. Oligonucleotides can be synthesized manually or by an automated
30 synthesizer, by covalently linking the 5' end of one nucleotide with the 3' end of another nucleotide with non-phosphodiester internucleotide linkages such alkyl-

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 35 -

phosphonates, phosphorothioates, phosphorodithioates, alkylphosphonothioates, alkylphosphonates, phosphoramidates, phosphate esters, carbamates, acetamidate, carboxymethyl esters, carbonates, and phosphate triesters. See Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990.

Modifications of sphingosine kinase-like protein gene expression can be obtained by designing antisense oligonucleotides which will form duplexes to the control, 5', or regulatory regions of the sphingosine kinase-like protein gene. Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, *e.g.*, between positions -10 and +10 from the start site, are preferred. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or chaperons. Therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature (*e.g.*, Gee *et al.*, in Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). An antisense oligonucleotide also can be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Precise complementarity is not required for successful duplex formation between an antisense oligonucleotide and the complementary sequence of a sphingosine kinase-like protein polynucleotide. Antisense oligonucleotides which comprise, for example, 2, 3, 4, or 5 or more stretches of contiguous nucleotides which are precisely complementary to a sphingosine kinase-like protein polynucleotide, each separated by a stretch of contiguous nucleotides which are not complementary to adjacent sphingosine kinase-like protein nucleotides, can provide targeting specificity for sphingosine kinase-like protein mRNA. Preferably, each stretch of complementary contiguous nucleotides is at least 4, 5, 6, 7, or 8 or more nucleotides in length. Non-complementary intervening sequences are preferably 1, 2, 3, or 4 nucleotides in length. One skilled in the art can easily use the calculated melting point of an antisense-sense pair to determine the degree of mismatching which will be tolerated

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 36 -

between a particular antisense oligonucleotide and a particular sphingosine kinase-like protein polynucleotide sequence.

5 Antisense oligonucleotides can be modified without affecting their ability to hybridize to a sphingosine kinase-like protein polynucleotide. These modifications can be internal or at one or both ends of the antisense molecule. For example, internucleoside phosphate linkages can be modified by adding cholesteryl or diamine moieties with varying numbers of carbon residues between the amino groups and terminal ribose. Modified bases and/or sugars, such as arabinose instead of ribose, or
10 a 3', 5'-substituted oligonucleotide in which the 3' hydroxyl group or the 5' phosphate group are substituted, also can be employed in a modified antisense oligonucleotide. These modified oligonucleotides can be prepared by methods well known in the art. See, e.g., Agrawal *et al.*, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542,
15 1987.

Ribozymes

Ribozymes are RNA molecules with catalytic activity. See, e.g., Cech, *Science* 236, 1532-1539; 1987; Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568; 1990; Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609; 1992; Couture & Stinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515, 1996. Ribozymes can be used to inhibit gene function by cleaving an RNA sequence, as is known in the art (e.g., Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673). The mechanism
20 of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Examples include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of specific nucleotide sequences.

30 The coding sequence of a sphingosine kinase-like protein polynucleotide can be used to generate ribozymes which will specifically bind to mRNA transcribed from the

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 37 -

5 sphingosine kinase-like protein polynucleotide. Methods of designing and constructing ribozymes which can cleave other RNA molecules in trans in a highly sequence specific manner have been developed and described in the art (*see* Haseloff *et al. Nature 334*, 585-591, 1988). For example, the cleavage activity of ribozymes can be targeted to specific RNAs by engineering a discrete "hybridization" region into the ribozyme. The hybridization region contains a sequence complementary to the target RNA and thus specifically hybridizes with the target (*see, for example, Gerlach et al., EP 321,201*).

10 Specific ribozyme cleavage sites within a sphingosine kinase-like protein RNA target are initially identified by scanning the RNA molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the sphingosine kinase-like protein target RNA containing the cleavage site
15 can be evaluated for secondary structural features which may render the target inoperable. The suitability of candidate targets also can be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays. Longer complementary sequences can be used to increase the affinity of the hybridization sequence for the target. The hybridizing and
20 cleavage regions of the ribozyme can be integrally related; thus, upon hybridizing to the sphingosine kinase-like protein target RNA through the complementary regions, the catalytic region of the ribozyme can cleave the target.

Ribozymes can be introduced into cells as part of a DNA construct. Mechanical
25 methods, such as microinjection, liposome-mediated transfection, electroporation, or calcium phosphate precipitation, can be used to introduce a ribozyme-containing DNA construct into cells in which it is desired to decrease sphingosine kinase-like protein expression. Alternatively, if it is desired that the cells stably retain the DNA construct, it can be supplied on a plasmid and maintained as a separate element or
30 integrated into the genome of the cells, as is known in the art. The DNA construct can include transcriptional regulatory elements, such as a promoter element, an

enhancer or UAS element, and a transcriptional terminator signal, for controlling transcription of ribozymes in the cells.

5 As taught in Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673, ribozymes can be engineered so that ribozyme expression will occur in response to factors which induce expression of a target gene. Ribozymes also can be engineered to provide an additional level of regulation, so that destruction of sphingosine kinase-like protein mRNA occurs only when both a ribozyme and a target gene are induced in the cells.

10 *Differentially Expressed Genes*

Described herein are methods for the identification of genes whose products interact with human sphingosine kinase-like protein. Such genes may represent genes which are differentially expressed in disorders including, but not limited to, cancer, allergies including but not limited to asthma, central and peripheral nervous system disorders, and autoimmune disease. Further, such genes may represent genes which are differentially regulated in response to manipulations relevant to the progression or treatment of such diseases. Additionally, such genes may have a temporally modulated expression, increased or decreased at different stages of tissue or organism development. A differentially expressed gene may also have its expression modulated under control versus experimental conditions. In addition, the human sphingosine kinase-like gene or gene product may itself be tested for differential expression.

25 The degree to which expression differs in a normal versus a diseased state need only be large enough to be visualized via standard characterization techniques such as differential display techniques. Other such standard characterization techniques by which expression differences may be visualized include but are not limited to, quantitative RT (reverse transcriptase), PCR, and Northern analysis.

30

Identification of Differentially Expressed Genes

To identify differentially expressed genes total RNA or, preferably, mRNA is isolated from tissues of interest. For example, RNA samples are obtained from tissues of experimental subjects and from corresponding tissues of control subjects. Any RNA isolation technique which does not select against the isolation of mRNA may be utilized for the purification of such RNA samples. See, for example, Ausubel *et al.*, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993. Large numbers of tissue samples may readily be processed using techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, the single-step RNA isolation process of Chortoczynski, U.S. Patent 4,843,155.

Transcripts within the collected RNA samples which represent RNA produced by differentially expressed genes are identified by methods well known to those of skill in the art. They include, for example, differential screening (Tedder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 208-12, 1988), subtractive hybridization (Hedrick *et al.*, *Nature* 308, 149-53; Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2825, 1984), and, preferably, differential display (Liang & Pardee, *Science* 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 5,262,311).

The differential expression information may itself suggest relevant methods for the treatment of disorders involving the human sphingosine kinase-like protein. For example, treatment may include a modulation of expression of the differentially expressed genes and/or the gene encoding the human sphingosine kinase-like protein. The differential expression information may indicate whether the expression or activity of the differentially expressed gene or gene product or the human sphingosine kinase-like gene or gene product are up-regulated or down-regulated.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 40 -

Screening Methods

The invention provides methods for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds which bind to sphingosine kinase-like protein polypeptides or polynucleotides and/or have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, expression or activity of the sphingosine kinase-like protein polypeptide or polynucleotide, so as to regulate degradation of the polyamines. Decreased intracellular signaling is useful for preventing or suppressing malignant cells from metastasizing. Increased intracellular signaling may be desired, for example, in developmental disorders characterized by inappropriately low levels of intracellular signaling or in regeneration.

The invention provides assays for screening test compounds which bind to or modulate the activity of a sphingosine kinase-like protein polypeptide or a sphingosine kinase-like protein polynucleotide. A test compound preferably binds to a sphingosine kinase-like protein polypeptide or polynucleotide. More preferably, a test compound decreases a sphingosine kinase-like protein activity of a sphingosine kinase-like protein polypeptide or expression of a sphingosine kinase-like protein polynucleotide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the test compound.

Test Compounds

Test compounds can be pharmacologic agents already known in the art or can be compounds previously unknown to have any pharmacological activity. Such compounds also may include, but are not limited to, other cellular proteins, peptides such as, for example, soluble peptides, including but not limited to, Ig-tailed fusion peptides, comprising extracellular portions of target gene product transmembrane receptors, and members of random peptide libraries (Lam, *et al.*, *Nature* 354, 82-84, 1991; Houghten *et al.*, *Nature* 354, 84-86, 1991), made of D- and/or L-configuration amino acids, phosphopeptides (including, but not limited to members of random or

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 41 -

partially degenerate, directed phosphopeptide libraries (Songyang *et al.*, *Cell* 72, 767-78, 1993), antibodies (including, but not limited to, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and Fab, F(ab')₂ and Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments thereof), and small
5 organic or inorganic molecules.

The compounds can be naturally occurring or designed in the laboratory. They can be isolated from microorganisms, animals, or plants, and can be produced recombinantly, or synthesized by chemical methods known in the art. If desired, test
10 compounds can be obtained using any of the numerous combinatorial library methods known in the art, including but not limited to, biological libraries, spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries, synthetic library methods requiring deconvolution, the "one-bead one-compound" library method, and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological
15 library approach is limited to polypeptide libraries, while the other four approaches are applicable to polypeptide, non-peptide oligomer, or small molecule libraries of compounds. *See* Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

Methods for the synthesis of molecular libraries are well known in the art (*see*, for
20 example, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Libraries of compounds can be presented in solution
25 (*see, e.g.*, Houghten, *Biotechniques* 13, 412-421, 1992), or on beads (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacteria or spores (Ladner, U.S. Patent 5,223,409), plasmids (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992), or phage (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; and Ladner, U.S. Patent 5,223,409).

High Throughput Screening

Test compounds can be screened for the ability to bind to sphingosine kinase-like protein polypeptides or polynucleotides or to affect sphingosine kinase-like protein activity or sphingosine kinase-like protein gene expression using high throughput screening. Using high throughput screening, many discrete compounds can be tested in parallel so that large numbers of test compounds can be quickly screened. The most widely established techniques utilize 96-well microtiter plates. The wells of the microtiter plates typically require assay volumes that range from 50 to 500 μ l. In addition to the plates, many instruments, materials, pipettors, robotics, plate washers, and plate readers are commercially available to fit the 96-well format.

Alternatively, "free format assays," or assays that have no physical barrier between samples, can be used. For example, an assay using pigment cells (melanocytes) in a simple homogeneous assay for combinatorial peptide libraries is described by Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). The cells are placed under agarose in petri dishes, then beads that carry combinatorial compounds are placed on the surface of the agarose. The combinatorial compounds are partially released the compounds from the beads. Active compounds can be visualized as dark pigment areas because, as the compounds diffuse locally into the gel matrix, the active compounds cause the cells to change colors.

Another example of a free format assay is described by Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches," reported at the First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 7-10, 1995). Chelsky placed a simple homogenous enzyme assay for carbonic anhydrase inside an agarose gel such that the enzyme in the gel would cause a color change throughout the gel. Thereafter, beads carrying combinatorial compounds via a photolinker were placed inside the gel and the compounds were partially released by UV-light. Compounds that inhibited the enzyme were observed as local zones of inhibition having less color change.

Yet another example is described by Salmon *et al.*, *Molecular Diversity 2*, 57-63 (1996). In this example, combinatorial libraries were screened for compounds that had cytotoxic effects on cancer cells growing in agar.

5

Another high throughput screening method is described in Beutel *et al.*, U.S. Patent 5,976,813. In this method, test samples are placed in a porous matrix. One or more assay components are then placed within, on top of, or at the bottom of a matrix such as a gel, a plastic sheet, a filter, or other form of easily manipulated solid support.

10

When samples are introduced to the porous matrix they diffuse sufficiently slowly, such that the assays can be performed without the test samples running together.

Binding Assays

15

For binding assays, the test compound is preferably a small molecule which binds to and occupies the active site or the diacylglycerol kinase domain of the sphingosine kinase-like protein polypeptide, such that normal biological activity is prevented. Examples of such small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules. In binding assays, either the test compound or the sphingosine kinase-like protein polypeptide can comprise a detectable label, such as a fluorescent, radioisotopic, chemiluminescent, or enzymatic label, such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase. Detection of a test compound which is bound to the sphingosine kinase-like protein polypeptide can then be accomplished, for example, by direct counting of radioemission, by scintillation counting, or by determining conversion of an appropriate substrate to a detectable product.

20

25

Alternatively, binding of a test compound to a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be determined without labeling either of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect binding of a test compound with a target polypeptide. A microphysiometer (*e.g.*, Cytosensor™) is an analytical

30

instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a test compound and a sphingosine kinase-like protein polypeptide. (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

Determining the ability of a test compound to bind to a sphingosine kinase-like protein polypeptide also can be accomplished using a technology such as real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA). Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991, and Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995. BIA is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore™). Changes in the optical phenomenon surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

In yet another aspect of the invention, a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be used as a "bait protein" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *Biotechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; and Brent W094/10300), to identify other proteins which bind to or interact with the sphingosine kinase-like protein polypeptide and modulate its activity.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. For example, in one construct a polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide is fused to a polynucleotide encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other construct, a DNA sequence that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a polynucleotide that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are

- able to interact *in vivo* to form a protein-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ), which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor.
- 5 Expression of the reporter gene can be detected, and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the DNA sequence encoding the protein which interacts with the sphingosine kinase-like protein polypeptide.
- 10 It may be desirable to immobilize either the sphingosine kinase-like protein polypeptide (or polynucleotide) or the test compound to facilitate separation of bound from unbound forms of one or both of the interactants, as well as to accommodate automation of the assay. Thus, either the sphingosine kinase-like protein polypeptide (or polynucleotide) or the test compound can be bound to a solid support. Suitable
- 15 solid supports include, but are not limited to, glass or plastic slides, tissue culture plates, microtiter wells, tubes, silicon chips, or particles such as beads (including, but not limited to, latex, polystyrene, or glass beads). Any method known in the art can be used to attach the sphingosine kinase-like protein polypeptide (or polynucleotide) or test compound to a solid support, including use of covalent and non-covalent
- 20 linkages, passive absorption, or pairs of binding moieties attached respectively to the polypeptide or test compound and the solid support. Test compounds are preferably bound to the solid support in an array, so that the location of individual test compounds can be tracked. Binding of a test compound to a sphingosine kinase-like protein polypeptide (or polynucleotide) can be accomplished in any vessel suitable
- 25 for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and microcentrifuge tubes.
- In one embodiment, a sphingosine kinase-like protein polypeptide is a fusion protein comprising a domain that allows the sphingosine kinase-like protein polypeptide to
- 30 be bound to a solid support. For example, glutathione-S-transferase fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.)

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 46 -

or glutathione derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and the non-adsorbed sphingosine kinase-like protein polypeptide; the mixture is then incubated under conditions conducive to complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components. Binding of the interactants can be determined either directly or indirectly, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the solid support before binding is determined.

Other techniques for immobilizing polypeptides or polynucleotides on a solid support also can be used in the screening assays of the invention. For example, either a sphingosine kinase-like protein polypeptide (or polynucleotide) or a test compound can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated sphingosine kinase-like protein polypeptides or test compounds can be prepared from biotin-NHS(N-hydroxysuccinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which specifically bind to a sphingosine kinase-like protein polypeptide polynucleotides, or a test compound, but which do not interfere with a desired binding site, such as the active site or a fibronectin domain of the sphingosine kinase-like protein polypeptide, can be derivatized to the wells of the plate. Unbound target or protein can be trapped in the wells by antibody conjugation.

Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies which specifically bind to the sphingosine kinase-like protein polypeptide (or polynucleotides) or test compound, enzyme-linked assays which rely on detecting a sphingosine kinase-like protein activity of the sphingosine kinase-like protein polypeptide, and SDS gel electrophoresis under non-reducing conditions.

30

Screening for test compounds which bind to a sphingosine kinase-like protein polypeptide or polynucleotide also can be carried out in an intact cell. Any cell which comprises a sphingosine kinase-like protein polynucleotide or polypeptide can be used in a cell-based assay system. A sphingosine kinase-like protein polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Either a primary culture or an established cell line, including neoplastic cell lines such as the colon cancer cell lines HCT116, DLD1, HT29, Caco2, SW837, SW480, and RKO, breast cancer cell lines 21-PT, 21-MT, MDA-468, SK-BR3, and BT-474, the A549 lung cancer cell line, and the H392 glioblastoma cell line, can be used. An intact cell is contacted with a test compound. Binding of the test compound to a sphingosine kinase-like protein polypeptide or polynucleotide is determined as described above, after lysing the cell to release the sphingosine kinase-like protein polypeptide-test compound complex.

15 Enzyme Assays

Test compounds can be tested for the ability to increase or decrease a sphingosine kinase-like protein activity of a sphingosine kinase-like protein polypeptide. Sphingosine kinase-like protein activity can be measured, for example, as described in Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 19513-20, 2000. Sphingosine kinase-like protein activity can be measured after contacting either a purified sphingosine kinase-like protein polypeptide, a cell extract, or an intact cell with a test compound. A test compound which decreases sphingosine kinase-like protein activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential therapeutic agent for decreasing intracellular signaling. A test compound which increases sphingosine kinase-like protein activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% is identified as a potential therapeutic agent for increasing intracellular signaling.

Gene Expression

In another embodiment, test compounds which increase or decrease sphingosine kinase-like protein gene expression are identified. A sphingosine kinase-like protein polynucleotide is contacted with a test compound, and the expression of an RNA or polypeptide product of the sphingosine kinase-like protein polynucleotide is determined. The level of expression of sphingosine kinase-like protein mRNA or polypeptide in the presence of the test compound is compared to the level of expression of sphingosine kinase-like protein mRNA or polypeptide in the absence of the test compound. The test compound can then be identified as a modulator of expression based on this comparison. For example, when expression of sphingosine kinase-like protein mRNA or polypeptide is greater in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as a stimulator or enhancer of sphingosine kinase-like protein mRNA or polypeptide is less expression. Alternatively, when expression of the mRNA or protein is less in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as an inhibitor of sphingosine kinase-like protein mRNA or polypeptide expression.

The level of sphingosine kinase-like protein mRNA or polypeptide expression in the cells can be determined by methods well known in the art for detecting mRNA or protein. Either qualitative or quantitative methods can be used. The presence of polypeptide products of a sphingosine kinase-like protein polynucleotide can be determined, for example, using a variety of techniques known in the art, including immunochemical methods such as radioimmunoassay, Western blotting, and immunohistochemistry. Alternatively, polypeptide synthesis can be determined *in vivo*, in a cell culture, or in an *in vitro* translation system by detecting incorporation of labeled amino acids into a sphingosine kinase-like protein polypeptide.

Such screening can be carried out either in a cell-free assay system or in an intact cell. Any cell which expresses a sphingosine kinase-like protein polynucleotide can be used in a cell-based assay system. The sphingosine kinase-like protein poly-

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 49 -

nucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Either a primary culture or an established cell line, including neoplastic cell lines such as the colon cancer cell lines HCT116, DLD1, HT29, Caco2, SW837, SW480, and RKO, breast cancer cell lines 21-PT, 21-MT, MDA-468, SK-BR3, and BT-474, the A549 lung cancer cell line, and the H392 glioblastoma cell line, can be used.

Pharmaceutical Compositions

10 The invention also provides pharmaceutical compositions which can be administered to a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of the invention can comprise a sphingosine kinase-like protein polypeptide, sphingosine kinase-like protein polynucleotide, antibodies which specifically bind to a sphingosine kinase-like protein polypeptide, or mimetics, agonists, antagonists, or
15 inhibitors of a sphingosine kinase-like protein polypeptide. The compositions can be administered alone or in combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which can be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions can be administered to a patient alone, or in combination with other
20 agents, drugs or hormones.

In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions can contain suitable pharmaceutically-acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be
25 used pharmaceutically. Pharmaceutical compositions of the invention can be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, parenteral, topical, sublingual, or rectal means. Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using
30 pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 50 -

formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

5 Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, 10 hydroxypropylmethyl-cellulose, or sodium carboxymethylcellulose; gums including arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents can be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

15 Dragee cores can be used in conjunction with suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which also can contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments can be added to the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity 20 of active compound, *i.e.*, dosage.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a 25 filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds can be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

30 Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration can be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks'

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 51 -

5 solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions can contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspensions of the active compounds can be prepared as appropriate oily injection
10 suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Non-lipid polycationic amino polymers also can be used for delivery. Optionally, the suspension also can contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated
15 solutions. For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in a
15 manner that is known in the art, *e.g.*, by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. The pharmaceutical composition can be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in
20 aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation can be a lyophilized powder which can contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, that is combined with buffer prior to use.

25 Further details on techniques for formulation and administration can be found in the latest edition of REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. Such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

30

Therapeutic Indications and Methods

The novel human sphingosine kinase-like protein sequence, and in particular the sequence at the 5' end of the mRNA can be used in antisense nucleic acid production, diagnosis of over- or under-expression of human sphingosine kinase-like protein, and in detecting disease-related mutations in the human sphingosine kinase-like protein gene. The sequence can also be transfected into host cells to produce human sphingosine kinase-like protein-expressing cells for use in drug screening. Regulators of human sphingosine kinase-like protein can be used as agents to treat inflammation related to allergy, infection, trauma, or exposure to toxic compounds, or to treat diseases such as infection, hereditary diseases, autoimmune diseases, cancer, neurodegenerative diseases, and cardiovascular diseases. More specifically, human sphingosine kinase-like protein-regulating agents can be beneficial in the prevention of tumor proliferation and invasion and in the promotion of tumor cell apoptosis; in the inhibition of angiogenesis in disease states such as rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, psoriasis, and cancer, and in the promotion of new blood vessel growth in heart disease, wound healing, and bone marrow transplantation; in the regulation of smooth muscle cell proliferation in disease states such as atherosclerosis and asthma; in the modulation of cellular responsiveness to stress such as in ischemic tissue injury; in the maintenance of cardiac function; and in the regulation of vesicular trafficking, tissue invasion, activation, and apoptosis of inflammatory cells.

1. Allergies. Regulation of sphingosine kinase-like protein activity provides a method of treating allergies. The first step in the pathogenesis of an allergic response is the production of immunoglobulin E (IgE) antibody in response to an allergen. Upon exposure to allergens the B cells of responsive individuals secrete IgE molecules specific to the allergen. IgE molecules bind to the high affinity IgE receptor (FcRI) present on mast cells and basophils. (See U.S. Patent No. 5,977,072).

IgE binding activates the release of a variety of vasoactive mediators which promote allergic and inflammatory responses. Activation occurs whenever two or more FcRIs are crosslinked via bound IgE molecules that in turn form an aggregate with an allergen molecule. Such aggregation initiates a biochemical cascade which releases histamine and proteases from cytoplasmic granules and leads to the synthesis of prostaglandins, leukotrienes, cytokines and other effectors of the hypersensitivity response.

Mast cells and basophils accumulate at sites of inflammation and, upon activation, secrete hematopoietic growth factors such as granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-6. These factors propagate the inflammatory response by recruiting, priming, and activating inflammatory cells such as neutrophils, macrophages and eosinophils. The activated cells accumulate in areas of ongoing inflammation, tumor invasion, angiogenesis, fibrosis, and thrombosis. The IgE-dependent activation of cells via FcRI results in an inflammatory response directed towards local tissue defense, tissue maintenance and remodeling, and immunoregulation (Gagari, E. et al (1997) *Blood* 89:2654-2663).

IgE binding to the FcRI activates kinases which are bound to the receptor under resting conditions. The phosphorylated receptor activates sphingosine kinase, which induces the production of sphingosine-1-phosphate (SPP) and contributes to calcium mobilization in mast cells. The phosphorylated receptor also activates tyrosine kinases, such as Lyn and Syk, which induce the tyrosine phosphorylation of cytoplasmic molecules including phospholipase C. Phosphorylated phospholipase C hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and liberates inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol. The latter mobilizes Ca^{2+} from intracellular and extracellular sources and activates protein kinase C (Paolini, R. et al. (1991) *Nature* 353: 855-858; and Beaven, M. A. and Baumgartner, R. A. (1996) *Curr. Opin. Immunol.* 8:766-772).

5 SPP has diverse biological functions, acting both inside cells as a second messenger to regulate Ca^{2+} mobilization, cell activation, proliferation, and survival, and extracellularly as a ligand for GPCRs of the EDG family (EDG-1,3,5,6 and 8). SPP is synthesized in response to extracellular stimuli by the sequential action of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. Many lines of evidence have shown that sphingosine kinase activity is regulated at both the transcription and translation levels and plays crucial roles in SIP production.

10

2. The sphingosine kinases may be important in the pathogenesis of asthma and other inflammatory diseases. Significant elevations in SPP levels in bronchoalveolar lavage fluid have been observed in asthmatic subjects following segmental antigen challenge. SPP (itself or in synergy with PDGF) 15 has also been reported to regulate airway smooth muscle proliferation, contraction, and IL-6 production. Additionally, it has been demonstrated that the balance between sphingosine and SIP is decisive for the activation of mast cells, a cell type implicated as an initiator of many asthmatic symptoms, where Sphingosine kinase1 acts as a permissive switch for their stimulation. 20 Inhibition of sphingosine kinases in mast cells leads to a decrease in Ca^{2+} mobilization, mast cell degranulation, and leukotriene and cytokine synthesis and secretion. Similarly, inhibition of sphingosine kinase activity in endothelial cells leads to the decreased expression of the adhesion molecules E-selectin and VCAM-1 induced by TNF- α .

25

Sphingosine kinase-like protein resembles the two known sphingosine kinases in possessing a diacylglycerol kinase catalytic domain which is presumed to give sphingosine kinases the ability to phosphorylate D-threo-sphingosine. It differs from the other two sphingosine kinases, however, in 30 additionally having a pleckstrin homology (PH) domain at its N-terminal (see diagram below). PH is a domain commonly found in signaling proteins and

has multiple functions including the ability to bind inositol phosphates, beta/gamma subunits of G proteins, phosphorylated Ser/Thr residues of proteins, and membranes. The three human sphingosine kinases, SPHK1, SPHK 2, and sphingosine kinase-like, encode proteins of 384, 618, and 537 amino acids respectively. In addition to the differences in length, the sphingosine kinases also show differences in tissue distribution. Of the three, sphingosine kinase-like appears to have the broadest distribution, being found expressed in nearly all tissues tested. Notably, however, it is expressed highest in microvascular endothelial cells, a cell type found throughout the body. This indicates that sphingosine kinase-like, more so than other sphingosine kinases, may play an important role in the activation of endothelial cells, regulating their adhesion molecule expression, cell-to-cell contact, cytokine and growth factor secretion, proliferation, and angiogenesis. Accordingly, sphingosine kinase-like may be a crucial regulator of immune cell trafficking, controlling the interaction between blood leukocytes and endothelial cells, and allowing leukocytes to extravasate into tissues. Regulation of Sphingosine kinase-like would therefore be expected to be beneficial in the treatment of diseases in which there is an overactive or unwanted immune response, or in diseases in which overproduction of cytokines, such as tumor necrosis factor, compromises the integrity of the vascular endothelium.

3. Cancer. Regulation of sphingosine kinase-like protein activity may provide a method of treating cancer. Cancer is a disease fundamentally caused by oncogenic cellular transformation. There are several hallmarks of transformed cells that distinguish them from their normal counterparts and underlie the pathophysiology of cancer. These include uncontrolled cellular proliferation, unresponsiveness to normal death-inducing signals (immortalization), increased cellular motility and invasiveness, increased ability to recruit blood supply through induction of new blood vessel formation (angiogenesis), genetic instability, and dysregulated gene expression.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 56 -

Various combinations of these aberrant physiologies, along with the acquisition of drug-resistance frequently lead to an intractable disease state in which organ failure and patient death ultimately ensue.

5 Most standard cancer therapies target cellular proliferation and rely on the differential proliferative capacities between transformed and normal cells for their efficacy. This approach is hindered by the facts that several important normal cell types are also highly proliferative and that cancer cells frequently become resistant to these agents. Thus, the therapeutic indices for traditional
10 anti-cancer therapies rarely exceed 2.0.

The advent of genomics-driven molecular target identification has opened up the possibility of identifying new cancer-specific targets for therapeutic intervention that will provide safer, more effective treatments for cancer
15 patients. Thus, newly discovered tumor-associated genes and their products can be tested for their role(s) in disease and used as tools to discover and develop innovative therapies. Genes playing important roles in any of the physiological processes outlined above can be characterized as cancer targets.

20 Genes or gene fragments identified through genomics can readily be expressed in one or more heterologous expression systems to produce functional recombinant proteins. These proteins are characterized *in vitro* for their biochemical properties and then used as tools in high-throughput molecular screening programs to identify chemical modulators of their
25 biochemical activities. Agonists and/or antagonists of target protein activity can be identified in this manner and subsequently tested in cellular and *in vivo* disease models for anti-cancer activity. Optimization of lead compounds with iterative testing in biological models and detailed pharmacokinetic and toxicological analyses form the basis for drug development and subsequent
30 testing in humans.

Increased sphingosine kinase activity is been associated with enhanced cellular proliferation. Thus, downregulation of sphingosine kinase-like protein activity is an attractive therapeutic approach to the treatment and prevention of cancer.

5

4. Autoimmune disease. The principal physiologic function of the immune system is the elimination of infectious organisms. The effector mechanisms that are responsible for protective immunity are also capable of injuring host tissues. In some situations, specific immune responses have little or no protective value, and the harmful consequences become dominant. The best example of this is autoimmune disease caused by pathologic immune responses against self-antigens. (See U.S. Patent No. 6,098,631).

10

Potentially harmful immune reactions may be prevented either by functionally inactivating or killing the responding lymphocytes. The primary cytolytic mechanism involved in controlling lymphocyte responses is the Fas-mediated apoptotic pathway. Using this pathway, the immune system actively eliminates potentially harmful cells so that the host may survive. See A. Abbas, "Die and Let Live: Eliminating Dangerous Lymphocytes," *Cell* 84:655 (1996). Abnormalities in Fas-mediated cell death pathways may result in autoimmunity even in situations in which Fas and Fas Ligand are themselves normal. For example, where apoptosis is inhibited and a proliferation pathway is stimulated, activated lymphocytes may escape elimination and cause disease.

15

20

Established treatments of autoimmune disease are designed to inhibit either final common pathways of inflammation or immunological mediators. Both approaches are non-specific and, therefore, are associated with severe side effects, such as musculoskeletal, metabolic, neurologic and connective tissue side effects, immunosuppression, bone marrow and gastrointestinal toxicity, liver damage, lung disease, hypersensitivity reactions, deafness, renal toxicity, mucocutaneous toxicity. See, R. Million et al., *Lancet* 1:812 (1984), J. A. Engelbrecht et al., *Arthritis and*

30

Rheumatism 26:1275 (1983), G. W. Cannon et al., *Arthritis and Rheumatism* 26:1269 (1983), Simon and Mills, "Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs," *N. Eng. J. Med.* 302:1179. (1980), Katz et al., *Ann. Int. Med.* 101:176 (1984), W. F. Kean et al., *Arthritis and Rheumatism* 23:158 (1980).

5

Thus, current therapies for autoimmune diseases are associated with high incidence of serious side effects. Furthermore, although some medications may offer symptomatic relief, in many cases, they do not significantly modify the progression of symptoms such as joint destruction. What is needed is an effective therapeutic approach with lower toxicity such that the treatment is better tolerated and more appropriate for the treatment of autoimmune diseases.

10

SPP has been recently shown to inhibit the Fas-mediated cell death pathway. See O. Cuvillier et al., "Suppression of ceramide-mediated Programmed Cell Death By Sphingosine-1-phosphate," *Nature* 381:800 (1996). Thus, inhibition of sphingosine kinase-like protein activity is a viable approach to reversing the inhibition of Fas-mediated apoptosis by preventing the formation of SPP. SPP is produced from sphingosine by the activity of sphingosine kinase. The net effect of SPP is inhibition of ceramide-mediated cell death. Thus, regulation of sphingosine kinase-like protein may provide a method of treating or preventing autoimmune disease such as, for example, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, Grave's disease, multiple sclerosis (MS), and Type I diabetes..

15

20

The invention further pertains to the use of novel agents identified by the screening assays described above. Accordingly, it is within the scope of this invention to use a test compound identified as described herein in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (e.g., a modulating agent, an antisense nucleic acid molecule, a specific antibody, ribozyme, or a polypeptide-binding partner) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of

25

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 59 -

action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

5 A reagent which affects sphingosine kinase-like protein activity can be administered to a human cell, either *in vitro* or *in vivo*, to reduce sphingosine kinase-like protein activity. The reagent preferably binds to an expression product of a human sphingosine kinase-like protein gene. If the expression product is a polypeptide, the reagent is preferably an antibody. For treatment of human cells *ex vivo*, an antibody can be added to a preparation of stem cells which have been removed from the body.
10 The cells can then be replaced in the same or another human body, with or without clonal propagation, as is known in the art.

In one embodiment, the reagent is delivered using a liposome. Preferably, the liposome is stable in the animal into which it has been administered for at least about
15 30 minutes, more preferably for at least about 1 hour, and even more preferably for at least about 24 hours. A liposome comprises a lipid composition that is capable of targeting a reagent, particularly a polynucleotide, to a particular site in an animal, such as a human. Preferably, the lipid composition of the liposome is capable of targeting to a specific organ of an animal, such as the lung or liver.

20 A liposome useful in the present invention comprises a lipid composition that is capable of fusing with the plasma membrane of the targeted cell to deliver its contents to the cell. Preferably, the transfection efficiency of a liposome is about 0.5 μg of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about 10^6 cells, more
25 preferably about 1.0 μg of DNA per 16 nmol of liposome delivered to about 10^6 cells, and even more preferably about 2.0 μg of DNA per 16 nmol of liposome delivered to about 10^6 cells. Preferably, a liposome is between about 100 and 500 nm, more preferably between about 150 and 450 nm, and even more preferably between about 200 and 400 nm in diameter.

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 60 -

5 Suitable liposomes for use in the present invention include those liposomes standardly used in, for example, gene delivery methods known to those of skill in the art. More preferred liposomes include liposomes having a polycationic lipid composition and/or liposomes having a cholesterol backbone conjugated to polyethylene glycol. Optionally, a liposome comprises a compound capable of targeting the liposome to a tumor cell, such as a tumor cell ligand exposed on the outer surface of the liposome.

10 Complexing a liposome with a reagent such as an antisense oligonucleotide or ribozyme can be achieved using methods which are standard in the art (see, for example, U.S. Patent 5,705,151). Preferably, from about 0.1 μg to about 10 μg of polynucleotide is combined with about 8 nmol of liposomes, more preferably from about 0.5 μg to about 5 μg of polynucleotides are combined with about 8 nmol liposomes, and even more preferably about 1.0 μg of polynucleotides is combined with about 8 nmol liposomes.

15 In another embodiment, antibodies can be delivered to specific tissues *in vivo* using receptor-mediated targeted delivery. Receptor-mediated DNA delivery techniques are taught in, for example, Findeis *et al.* *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

25 If the reagent is a single-chain antibody, polynucleotides encoding the antibody can be constructed and introduced into a cell either *ex vivo* or *in vivo* using well-established techniques including, but not limited to, transferrin-polycation-mediated DNA transfer, transfection with naked or encapsulated nucleic acids, liposome-mediated cellular fusion, intracellular transportation of DNA-coated latex beads, protoplast fusion, viral infection, electroporation, "gene gun," and DEAE- or calcium phosphate-mediated transfection.

30

Determination of a Therapeutically Effective Dose

5 The determination of a therapeutically effective dose is well within the capability of those skilled in the art. A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient which increases or decreases intracellular signaling relative to that which occurs in the absence of the therapeutically effective dose.

10 For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model also can be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

15 Therapeutic efficacy and toxicity, *e.g.*, ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population), can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD₅₀/ED₅₀.

20 Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

25 The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active ingredient or to maintain the desired effect. Factors which can be taken into account include the severity of the disease state,

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 62 -

5 general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions can be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

10 Normal dosage amounts can vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose of about 1 g, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

15 Effective *in vivo* dosages of an antibody are in the range of about 5 μg to about 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, about 50 μg to about 5 mg/kg , about 100 μg to about 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patient body weight, and about 200 to about 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of patient body weight. For administration of polynucleotides encoding single-chain antibodies, effective *in vivo* dosages are in the range of about 100 ng to about 200 ng, 500 ng to about 50 mg, 20 about 1 μg to about 2 mg, about 5 μg to about 500 μg , and about 20 μg to about 100 μg of DNA.

25 If the expression product is mRNA, the reagent is preferably an antisense oligonucleotide or a ribozyme. Polynucleotides which express antisense oligonucleotides or ribozymes can be introduced into cells by a variety of methods, as described above.

30 Preferably, a reagent reduces expression of a sphingosine kinase-like protein polynucleotide or activity of a sphingosine kinase-like protein polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the reagent. The effectiveness of the mechanism chosen to decrease the

level of expression of a sphingosine kinase-like protein polynucleotide or the activity of a sphingosine kinase-like protein polypeptide can be assessed using methods well known in the art, such as hybridization of nucleotide probes to sphingosine kinase-like protein-specific mRNA, quantitative RT-PCR, immunologic detection of a sphingosine kinase-like protein polypeptide, or measurement of sphingosine kinase-like protein activity.

In any of the embodiments described above, any of the pharmaceutical compositions of the invention can be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy can be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents can act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus reducing the potential for adverse side effects.

Any of the therapeutic methods described above can be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

The above disclosure generally describes the present invention, and all patents and patent applications cited in this disclosure are expressly incorporated herein. A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples which are provided for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1*Detection of sphingosine kinase-like protein activity*

5 The polynucleotide of SEQ ID NO: 1 is inserted into the expression vector pCEV4 and the expression vector pCEV4-sphingosine kinase-like protein polypeptide obtained is transfected into human embryonic kidney 293 cells. From these cells extracts are obtained and sphingosine kinase-like protein activity is determined for 20 min at 37°C in a total volume of 200 µl, containing 10 µM [3H]sphingosine
10 (~105 cpm), 1 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), and HL-60 cytosol (120-200 µg of protein). Reactions are terminated by addition of 2 ml of ice-cold methanol. Extraction, TLC separation, and quantification of [3H]SPP are carried out. Sphingosine kinase-like protein activity is expressed as
15 pmol SPP formed per mg protein and 20 min. protein. It is shown that the polypeptide of SEQ ID NO: 2 has a sphingosine kinase-like protein activity.

EXAMPLE 2

20 *Identification of a test compound which binds to a sphingosine kinase-like protein polypeptide*

Purified sphingosine kinase-like protein polypeptides comprising a glutathione-S-transferase protein are absorbed onto glutathione-derivatized wells of 96-well
25 microtiter plates are contacted with test compounds from a small molecule library at pH 7.0 in a physiological buffer solution. Sphingosine kinase-like protein polypeptides comprise the amino acid sequence shown in SEQ ID NOS: 2, 10, and 11. The test compounds comprise a fluorescent tag. The samples are incubated for 5 minutes to one hour. Control samples are incubated in the absence of a test
30 compound.

The buffer solution containing the test compounds is washed from the wells. Binding of a test compound to a sphingosine kinase-like protein polypeptide is detected by fluorescence measurements of the contents of the wells. A test compound which increases the fluorescence in a well by at least 15% relative to fluorescence of a well in which a test compound was not incubated is identified as a compound which binds to a sphingosine kinase-like protein polypeptide.

EXAMPLE 3

10 *Identification of a test compound which decreases sphingosine kinase-like protein activity*

HEK293 cells are seeded at 6×10^5 /well in poly-L-lysine-coated 6-well plates and cultured for 24 hours. Cells are then transfected with vectors containing sphingosine kinase-like constructs and 6 μ l LipofectAMINE Plus reagent. An additional 4 μ l LipofectAMINE Plus reagent is added to each well as well as a suitable amount of a test compound from a small molecule library. Control wells receive no test compound. 1-3 days post-transfection, cells are harvested and lysed by freeze-thawing. Sphingosine kinase-like protein activity is measured in the presence of sphingosine. A test compound which decreases sphingosine kinase-like protein activity of the extract relative to the control extract by at least 20% is identified as a sphingosine kinase-like protein inhibitor. See Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 19513-20, 2000.

EXAMPLE 4

25 *Identification of a test compound which decreases sphingosine kinase-like protein gene expression*

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 66 -

A test compound is administered to a primary culture of MC3T3-E1 osteoblast cells and incubated at 37°C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells incubated for the same time without the test compound provides a negative control.

5 RNA is isolated from the two cultures as described in Chirgwin *et al.*, *Biochem. 18*, 5294-99, 1979). Northern blots are prepared using 20 to 30 µg total RNA and hybridized with a ³²P-labeled sphingosine kinase-like protein-specific probe at 65°C in Express-hyb (CLONTECH). The probe comprises at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NOS: 1 and 9. A test compound
10 which decreases the sphingosine kinase-like protein-specific signal relative to the signal obtained in the absence of the test compound is identified as an inhibitor of sphingosine kinase-like protein gene expression.

EXAMPLE 5

15

Treatment of a tumor with a reagent which specifically binds to a sphingosine kinase-like protein gene product

20 Synthesis of antisense sphingosine kinase-like protein oligonucleotides comprising at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NOS: 1 and 9 is performed on a Pharmacia Gene Assembler series synthesizer using the phosphoramidite procedure (Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev. 90*, 534-83, 1990). Following assembly and deprotection, oligonucleotides are ethanol-precipitated twice, dried, and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at the desired
25 concentration. Purity of these oligonucleotides is tested by capillary gel electrophoreses and ion exchange HPLC. Endotoxin levels in the oligonucleotide preparation are determined using the *Limulus* Amebocyte Assay (Bang, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.) 105*, 361-362, 1953).

30 A composition containing the antisense oligonucleotides at a concentration of 0.1-100 µM is administered directly into the tumor. Tumor size is monitored over a

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 67 -

period of days or weeks. Additional doses of the antisense oligonucleotides can be given during that time. Tumor growth is suppressed due to decreased sphingosine kinase-like protein activity.

5 **EXAMPLE 6**

Treatment of a rheumatoid arthritis with a reagent which specifically binds to a sphingosine kinase-like protein gene product

10 Synthesis of antisense sphingosine kinase-like protein oligonucleotides comprising at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NOS: 1 and 9 is performed on a Pharmacia Gene Assembler series synthesizer using the phosphoramidite procedure (Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 534-83, 1990). Following assembly and deprotection, oligonucleotides are ethanol-precipitated
15 twice, dried, and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at the desired concentration. Purity of these oligonucleotides is tested by capillary gel electrophoreses and ion exchange HPLC. Endotoxin levels in the oligonucleotide preparation are determined using the *Limulus* Amebocyte Assay (Bang, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 105, 361-362, 1953).

20

An aqueous composition containing the antisense oligonucleotides at a concentration of 0.1-100 μ M is administered to the patient using a needle.

25 Severity of rheumatoid arthritis atherosclerosis is monitored over a period of days or weeks by removing synovial fluid from the knee joint, isolating synovial T cells, and determining whether the T cells are resistant to Fas-mediated DNA fragmentation. Briefly, the T cells were lysed in TE buffer containing 0.2% Triton X -100, pH 8. Fragmented DNA was separated from intact chromatin by microfuging for 20 min, 14,000 rpm at 4°C. The resulting supernatant is treated with 1 mg/ml of proteinase K
30 at 37°C overnight, then extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) three times. DNA is precipitated by addition of three volumes of absolute ethanol, in

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 68 -

the presence of 0.3 M sodium acetate, pH 5.2, incubated overnight at -20°C and then pelleted by centrifugation at 14,000 rpm at 4°C for 20 min. The pellet is washed twice with 75% ethanol and dissolved in 30 µl of TE containing 10 µg/ml of RNase overnight at 37°C. DNA samples are separated by electrophoresis on 1.8% agarose gel in the presence of ethidium bromide. Additional injections of the antisense oligonucleotides can be given during that time. Rheumatoid arthritis is suppressed due to decreased sphingosine kinase-like protein activity.

EXAMPLE 7

10

Proliferation inhibition assay: Antisense oligonucleotides suppress the growth of cancer cell lines

The cell line used for testing is the human colon cancer cell line HCT116. Cells are cultured in RPMI-1640 with 10-15% fetal calf serum at a concentration of 10,000 cells per milliliter in a volume of 0.5 ml and kept at 37 °C in a 95% air/5%CO₂ atmosphere.

Phosphorothioate oligoribonucleotides are synthesized on an Applied Biosystems Model 380B DNA synthesizer using phosphoramidite chemistry. A sequence of 24 bases is used as the test oligonucleotide: (1) 5'-TGG TTT CGT AAA TGA CCA TAA ATA-3' (complementary to the nucleotides at position 1 to 24 of SEQ ID NOS: 2, 10, and 11). As a control, another (random) sequence is used: 5'-TCA ACT GAC TAG ATG TAC ATG GAC-3'. Following assembly and deprotection, oligonucleotides are ethanol-precipitated twice, dried, and suspended in phosphate buffered saline at the desired concentration. Purity of the oligonucleotides is tested by capillary gel electrophoresis and ion exchange HPLC. The purified oligonucleotides are added to the culture medium at a concentration of 10 µM once per day for seven days.

30

The addition of the test oligonucleotide for seven days results in significantly reduced expression of human sphingosine kinase-like protein as determined by Western blotting. This effect is not observed with the control oligonucleotide. After 3 to 7 days, the number of cells in the cultures is counted using an automatic cell counter. The number of cells in cultures treated with the test oligonucleotide (expressed as 100%) is compared with the number of cells in cultures treated with the control oligonucleotide. The number of cells in cultures treated with the test oligonucleotide is not more than 30% of control, indicating that the inhibition of human sphingosine kinase-like protein has an anti-proliferative effect on cancer cells.

10

EXAMPLE 8

Quantitative Expression Profiling

Expression profiling is based on a quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis, also called kinetic analysis, first described in Higuchi et al., 1992 and Higuchi et al., 1993. The principle is that at any given cycle within the exponential phase of PCR, the amount of product is proportional to the initial number of template copies. Using this technique, the expression levels of particular genes, which are transcribed from the chromosomes as messenger RNA (mRNA), are measured by first making a DNA copy (cDNA) of the mRNA, and then performing quantitative PCR on the cDNA, a method called quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (quantitative RT-PCR).

20

Quantitative RT-PCR analysis of RNA from different human tissues was performed to investigate the tissue distribution of LBRI-221 (SEQ ID NOS: 2, 10, and 11), Sphingosine kinase-like mRNA. In most cases, 25 µg of total RNA from various tissues (including Human Total RNA Panel I-V, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) was used as a template to synthesize first-strand cDNA using the SUPERSCRIPTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Rockville, MD, USA). First-strand cDNA synthesis was carried out according to the

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 70 -

manufacturer's protocol using oligo (dT) to hybridize to the 3' poly A tails of mRNA and prime the synthesis reaction. Approximately 10 ng of the first-strand cDNA was then used as template in a polymerase chain reaction. In other cases, 10 ng of commercially available cDNAs (Human Immune System MTC Panel and Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) were used as template in a polymerase chain reaction. The polymerase chain reaction was performed in a LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), in the presence of the DNA-binding fluorescent dye SYBR Green I which binds to the minor groove of the DNA double helix, produced only when double-stranded DNA is successfully synthesized in the reaction (Morrison et al., 1998). Upon binding to double-stranded DNA, SYBR Green I emits light that can be quantitatively measured by the LightCycler machine. The polymerase chain reaction was carried out using oligonucleotide primers LBRI221-L3 (SEQ ID NO: 12) and LBRI221-R2 (SEQ ID NO: 13) and measurements of the intensity of emitted light were taken following each cycle of the reaction when the reaction had reached a temperature of 85°C. Intensities of emitted light were converted into copy numbers of the gene transcript per nanogram of template cDNA by comparison with simultaneously reacted standards of known concentration.

To correct for differences in mRNA transcription levels per cell in the various tissue types, a normalization procedure was performed using similarly calculated expression levels in the various tissues of five different housekeeping genes: glyceraldehyde-3-phosphatase (G3PDH), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), beta-actin, porphobilinogen deaminase (PBGD), and beta-2-microglobulin. The level of housekeeping gene expression is considered to be relatively constant for all tissues (Adams et al., 1993, Adams et al., 1995, Liew et al., 1994) and therefore can be used as a gauge to approximate relative numbers of cells per . μ g of total RNA used in the cDNA synthesis step. Except for the use of a slightly different set of housekeeping genes and the use of the LightCycler system to measure expression levels, the normalization procedure was similar to that described in the RNA Master Blot User Manual, Appendix C (1997, Clontech Laboratories,

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 71 -

Palo Alto, CA, USA). In brief, expression levels of the five housekeeping genes in all tissue samples were measured in three independent reactions per gene using the LightCycler and a constant amount (25 µg) of starting RNA. The calculated copy numbers for each gene, derived from comparison with simultaneously reacted standards of known concentrations, were recorded and the mean number of copies of each gene in all tissue samples was determined. Then for each tissue sample, the expression of each housekeeping gene relative to the mean was calculated, and the average of these values over the five housekeeping genes was found. A normalization factor for each tissue was then calculated by dividing the final value for one of the tissues arbitrarily selected as a standard by the corresponding value for each of the tissues. To normalize an experimentally obtained value for the expression of a particular gene in a tissue sample, the obtained value was multiplied by the normalization factor for the tissue tested. This normalization method was used for all tissues except those derived from the Human Blood Fractions MTC Panel, which showed dramatic variation in some housekeeping genes depending on whether the tissue had been activated or not. In these tissues, normalization was carried out with a single housekeeping gene, beta-2-microglobulin.

Results are given in Figs. 14 and 15, showing the experimentally obtained copy numbers of mRNA per 10 ng of first-strand cDNA on the left and the normalized values on the right. RNAs used for the cDNA synthesis, along with their supplier and catalog numbers are shown in tables 1 and 2.

EXAMPLE 9

Treatment of asthma with a reagent that specifically binds to a sphingosine kinase-like protein gene product

Synthesis of antisense sphingosine kinase-like protein oligonucleotides comprising at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NOS: 1 and 9 is performed on a Pharmacia Gene Assembler series synthesizer using the

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 72 -

phosphoroamidite procedure (Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 534-83, 1990). Following assembly and deprotection, oligonucleotides are ethanol-precipitated twice, dried, and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at the desired concentration. Purity of these oligonucleotides is tested by capillary gel electrophoreses and ion exchange HPLC. Endotoxin levels in the oligonucleotide preparation are determined using the *Limulus* Amebocyte Assay (Bang, *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)* 105, 361-362, 1953).

An aqueous composition containing the antisense oligonucleotides is administered to the patient by inhalation.

Severity of asthma is monitored over a period of days or weeks by noting changes in patients' asthmatic symptoms, measuring lung function, or measuring changes in markers of lung inflammation such as numbers of inflammatory cells or concentrations of inflammatory mediators in fluid sampled from patients' lungs by bronchoalveolar lavage. Asthma severity is reduced due to decreased sphingosine kinase-like protein activity.

EXAMPLE 10

In vivo validation of novel compounds

1. Tests for activity of T cells are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of costimulatory molecules-cytokines, cytokine receptors, signalling molecules, or other molecules involved in T cell activation.

Mouse anti-CD3-induced cytokine production model:

BALB/c mice are injected with a single intravenous injection of 10 µg of 145-2C11 (purified hamster anti-mouse CD3 monoclonal antibodies,

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 73 -

PHARMINGEN). Compound is administered intraperitoneally 60 min prior to the anti-CD3 mAb injection. Blood is collected 90 min after the antibody injection. Serum is obtained by centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min. Serum levels of cytokines, such as IL-2 and IL-4, or other secreted molecules are determined by an ELISA. Proteins which regulate the CD3 downstream signaling can be evaluated in this model.

2. Tests for activity of B cells are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of the B cell receptor, signaling molecules, or other molecules involved in B cell activation/immunoglobulin class switching.

Mouse anti-IgD induced IgE production model:

BALB/c mice are injected intravenously with 0.8 mg of purified goat anti-mouse IgD antibody or PBS (defined as day 0). Compound is administered intraperitoneally from day 0 to day 6. On day 7 blood is collected and serum is obtained by centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min. Serum levels of total IgE are determined by YAMASA's ELISA kit and other Ig subtypes are measured by an Ig ELISA KIT (Rougier Bio-tech's, Montreal, Canada). Proteins that regulate IgD downstream signaling and Ig class switching can be evaluated.

3. Tests for activity of monocytes/macrophages are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of signalling molecules, transcription factors.

Mouse LPS-induced TNF- α production model:

Compound is administered to BALB/c mice by intraperitoneal injection and one hour later the mice given LPS (200 μ g/mouse) by intraperitoneal injection. Blood is collected 90 minutes after the LPS injection and plasma is

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 74 -

obtained. TNF- α concentration in the sample is determined using an ELISA kit. Proteins that regulate downstream effects of LPS stimulation, such as NF- κ B activation, can be evaluated.

- 5 4. Tests for activity of eosinophils are used to evaluate agents that modulate the expression or activity of the eotaxin receptor, signaling molecules, cytoskeletal molecules, or adhesion molecules.

Mouse eotaxin-induced eosinophilia model:

- 10 BALB/c mice are injected intradermally with a 2.5 ml of air on days -6 and -3 to prepare an airpouch. On day 0, compound is administered intraperitoneally, and 30 minutes later, IL-5 (300 ng/mouse) is injected intravenously. After an additional 30 minutes, eotaxin is injected (3 μ g/mouse, i.d.). Four hours after the eotaxin injection, leukocytes in the airpouch
15 exudate are collected and the number of total cells is counted. Differential cell counts in the exudate are performed by staining with May-Grunwald Giemsa solution. Proteins that regulate signaling by the eotaxin receptor or regulate eosinophil trafficking can be evaluated.

- 20 5. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test in rats

- 6 Weeks old male Wistar rats are sensitized intradermally (i.d.) on their shaved backs with 50 μ l of 0.1 μ g/ml mouse anti-DNP IgE monoclonal antibody (SPE-7) under a light anesthesia. After 24 hours, the rats are
25 challenged intravenously with 1 ml of saline containing 0.6 mg DNP-BSA (30) (LSL CO., LTD) and 0.005 g of Evans blue. Compounds are injected intraperitoneally (i.p.) 0.5 hr prior to antigen injection. Rats without the sensitization, challenge, and compound treatment are used as a control and rats with sensitization, challenge and vehicle treatment are used to determine
30 the value without inhibition. Thirty minutes after the challenge, the rats are sacrificed, and the skin of the back is removed. Evans blue dye in the skin is

- 75 -

extracted in formamide overnight at 63°C. Absorbance at 620 nm is then measured to obtain the optical density of the leaked dye.

Percent inhibition of PCA with a compound is calculated as follows:

5

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\{(\text{mean vehicle value} - \text{sample value}) / (\text{mean vehicle value} - \text{mean control value})\} \times 100}$$

10

Proteins that regulate mast cell degranulation, vascular permeability, or receptor antagonists against histamine receptors, serotonin receptors, or cysteinyl leukotriene receptors can be evaluated.

6. Anaphylactic bronchoconstriction in rats

15

6 Weeks old male Wistar rats are sensitized intravenously (i.v.) with 10 µg mouse anti-DNP IgE, SPE-7, and 1 days later, the rats are challenged intravenously with 0.3 ml of saline containing 1.5 mg DNP-BSA (30) under anesthesia with urethane (1000 mg/kg, i.p.) and gallamine (50 mg/kg, i.v.). The trachea is cannulated for artificial respiration (2 ml/stroke, 70 strokes/min). Pulmonary inflation pressure (PIP) is recorded through a side-arm of the cannula connected to a pressure transducer. Changes in PIP reflect a change of both resistance and compliance of the lungs. To evaluate a compound, the compound is given i.v. 5 min before challenge.

20

25

Proteins that regulate mast cell degranulation, vascular permeability or receptor antagonists against histamine receptors, serotonin receptors, or cysteinyl leukotriene receptors can be evaluated. Proteins that regulate the contraction of smooth muscle can be also evaluated.

30

7. *T cell adhesion to smooth muscle cells or endothelial cells*

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 76 -

A purified population of T cells is prepared by ficoll density centrifugation followed by separation on a nylon wool column, rosetting with sheep red blood cells, or using magnetic beads coated with antibodies. The T cells are activated with mitogen for 36 to 42 hours and labeled with ^3H -thymidine during the last 16 hours of the activation. Airway smooth muscle cells or bronchial microvascular endothelial cells are obtained from lung transplant tissue, from bronchus resections from cancer patients, from cadavers, or as cell lines from commercial sources. If fresh tissue is used as the source of cells, the smooth muscle cells and endothelial cells can be isolated from tissue by dissection followed by digestion for 30-60 minutes in a solution containing 1.7 mM ethyleneglycol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 640 U/ml collagenase, 10 mg/ml soybean trypsin inhibitor, and 10 U/ml elastase. The smooth muscle cells or endothelial cells are grown in 24-well tissue culture dishes until confluent and then treated with a test compound and inflammatory mediators, such as $\text{TNF-}\alpha$, for 24 hours. To measure adhesion, 6×10^5 T cells are added per well and allowed to adhere for one hour at 37°C . Nonadherent cells are removed by washing six times gently with medium. Finally, the remaining adherent cells are lysed by adding 300 μl 1% Triton-X 100 in PBS to each well and quantitating the radioactivity in a scintillation counter. The percent binding is calculated as counts recovered from adherent cells/total input counts \times 100%.

Table 1: Whole-body-screen tissues

Tissue	Supplier	Panel name and catalog number
1. brain	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
2. heart	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
3. kidney	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
4. liver	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
5. lung	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
6. trachea	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
7. bone marrow	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
8. colon	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
9. small intestine	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
10. spleen	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
11. stomach	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
12. thymus	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
13. mammary gland	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
14. skeletal muscle	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
15. prostate	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
16. testis	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
17. uterus	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
18. cerebellum	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
19. fetal brain	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
20. fetal liver	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
21. spinal cord	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
22. placenta	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
23. adrenal gland	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
24. pancreas	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
25. salivary gland	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
26. thyroid	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1

Table 2: Blood/lung-screen tissues

Tissue	Supplier	Panel name and catalog number
1. lymph node	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
2. peripheral blood leukocytes	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
3. tonsil	Clontech	Human Immune System MTC Panel, K1426-1
4. peripheral blood mononuclear cells	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
5. peripheral blood mono nuclear cells - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
6. T-cell (CD8+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
7. T-cell (CD8+) - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
8. T-cell (CD4+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
9. T-cell (CD4+) - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
10. B-cell (CD19+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
11. B-cell (CD19+) - activated	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
12. Monocytes (CD14+)	Clontech	Human Blood Fractions MTC Panel, K1428-1
13. Th1 clone	In-house	
14. Th2 clone	In-house	
15. neutrophil	In-house	
16. neutrophil	In-house	
17. Normal Bronchial/ Tracheal Epithelial Cells	In-house	
18. Normal Bronchial/ Tracheal smooth muscle cell	In-house	
19. Normal lung fibroblast	In-house	
20. Microvascular Endothelial cell	In-house	
21. U937	In-house	
22. RAMOS	In-house	
23. Jurkat	In-house	
24. HeLaS3	In-house	
25. IMR-90	In-house	
26. HEK293	In-house	

REFERENCES

1. Liu, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275: 19513-19520 (2000).
5
2. Baumruker, T. and E.E. Prieschl, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 122: 85-90 (2000).
3. Takeshita, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, MOO2569200 (2000).
10
4. Ohta *et al.*, *FEBS Letters* (1994), 355(3), 267-70.
5. R. Million *et al.*, *Lancet* 1:812-816 (1984).
- 15 6. J. A. Engelbrecht *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 26(10):1275-1278 (1983).
7. G. W. Cannon *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 26(10):1269-1274 (1983).
8. Simon and Mills, *N. Eng. J. Med.* 302(21):1179-1243 (1980).
20
9. W. Katz *et al.*, *Ann. Int. Med.* 101:176-179 (1984).
10. W. F. Kean *et al.*, *Arthritis and Rheumatism* 23(2):158-164 (1980).
- 25 11. S. Nagata, *Advances in Immunology* 57:129-144 (1994).
12. R. N. Kolesnick *et al.*, *Biochem. Cell Biol.* 72:471-474 (1994).
13. M. Verheij *et al.*, *Nature* 380:75-79 (1996).
30
14. C. J. van Koppen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271(4):2082-2087 (1996).

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 80 -

15. O. Cu villier et al., *Nature* 381:800-803 (1996).
16. A. Abbas, *Cell* 84:655-657 (1996).
- 5 17. C. Jacob et al., *J. Immunol* 142(5):1500-1505 (1989).
18. K. Goodemote et al., *J. Biol. Chem.* 270:10272-10277 (1995).
- 10 19. G. H. Fisher et al., *Cell* 81:935-946 (1995).
20. F. Rieux-Laucat et al., *Science* 268:1347-1349 (1995).
21. M. Adachi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90:1756-1760 (1993).
- 15 22. B. S. Andrews et al., *J. Exp. Med.* 148:1198-1215 (1978).
23. H. Takayama et al., *Adv. Immunol.* 60:289-321 (1995).
- 20 24. D. W. Nicholson et al., *Nature* 376:37-43 (1995).
25. M. Tewari et al., *Cell* 81:801-869 (1995).
26. A. M. Chinnaiyan et al., *Cell* 81:505-512 (1995).
- 25 27. S. M. Krane and R.T. Salzman, *Am J. Med.* :75(4B):1-91(1983).
28. D. E. Furst, *Arth. & Rheum.* 37(1):1-9 (1994).
- 30 29. B. O. Barger et al., *Arth. & Rheum.* 27(6):601-605 (Jun. 1984).

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 81 -

30. H. B. Stein et al., *Ann. Int. Med.* 92:24-29 (1980).
31. C. J. Marshall, *Nature* 367:686 (1994).
- 5 32. G. L'Allemain, *Progress in Growth Factor Research* 5:291-334 (1994).
33. S. A. Susin et al., *J. Exp. Med.* 186(1):25-37 (1997).
34. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous
10 amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology*
10:413-417.
35. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR
analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.
15 *BioTechnology* 11:1026-1030.
36. T.B. Morrison, J.J. Weis & C.T. Wittwer (1998) Quantification of low-copy
transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.
Biotechniques 24:954-962.
- 20 37. Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fields, C. & Venter, C. (1993) 3,400 new
expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain.
Nature Genet. 4:256-265.
- 25 38. Adams, M. D., et al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and
expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence.
Nature 377 supp:3-174.
- 30 39. Liew, C. C., Hwang, D. M., Fung, Y. W., Laursen, C., Cukerman, E., Tsui,
S. & Lee, C. Y. (1994) A catalog of genes in the cardiovascular system as
identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10145-
10649.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 82 -

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide and being selected from the group consisting of:
- 5
- a) a polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- 10 amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;
15 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 10;
amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11; and
the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 11;
- 20 b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1 or 9;
- c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b);
- 25 d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code; and
- 30 e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d).

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 83 -

2. An expression vector containing any polynucleotide of claim 1.
3. A host cell containing the expression vector of claim 2.
- 5 4. A substantially purified sphingosine kinase-like protein polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.
5. A method for producing a sphingosine kinase-like protein polypeptide, wherein the method comprises the following steps:
 - 10 a) culturing the host cell of claim 3 under conditions suitable for the expression of the sphingosine kinase-like protein polypeptide; and
 - 15 b) recovering the sphingosine kinase-like protein polypeptide from the host cell culture.
6. A method for detection of a polynucleotide encoding a sphingosine kinase-like protein polypeptide in a biological sample comprising the following steps:
 - 20 a) hybridizing any polynucleotide of claim 1 to a nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
 - 25 b) detecting said hybridization complex.
7. The method of claim 6, wherein before hybridization, the nucleic acid material of the biological sample is amplified.
8. A method for the detection of a polynucleotide of claim 1 or a sphingosine
30 kinase-like protein polypeptide of claim 4 comprising the steps of:

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 84 -

contacting a biological sample with a reagent which specifically interacts with the polynucleotide or the sphingosine kinase-like protein polypeptide.

- 5 9. A diagnostic kit for conducting the method of any one of claims 6 to 8.
- 10 10. A method of screening for agents which decrease the activity of a sphingosine kinase-like protein, comprising the steps of:
- 10 contacting a test compound with any sphingosine kinase-like protein polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1;
- 15 detecting binding of the test compound to the sphingosine kinase-like protein polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of a sphingosine kinase-like protein.
- 20 11. A method of screening for agents which regulate the activity of a sphingosine kinase-like protein, comprising the steps of:
- 20 contacting a test compound with a sphingosine kinase-like protein polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1; and
- 25 detecting a sphingosine kinase-like protein activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the sphingosine kinase-like protein activity is identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of the sphingosine kinase-like protein, and wherein a test compound which decreases the sphingosine kinase-like protein activity of the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of the sphingosine kinase-like protein.
- 30 12. A method of screening for agents which decrease the activity of a sphingosine kinase-like protein, comprising the steps of:

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 85 -

- contacting a test compound with any polynucleotide of claim 1 and detecting binding of the test compound to the polynucleotide, wherein a test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of sphingosine kinase-like protein.
- 5
13. A method of reducing the activity of sphingosine kinase-like protein, comprising the steps of:
- 10 contacting a cell with a reagent which specifically binds to any polynucleotide of claim 1 or any sphingosine kinase-like protein polypeptide of claim 4, whereby the activity of sphingosine kinase-like protein is reduced.
14. A reagent that modulates the activity of a sphingosine kinase-like protein polypeptide or a polynucleotide wherein said reagent is identified by the method of any of the claim 10 to 12.
- 15
15. A pharmaceutical composition, comprising:
- 20 the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 and a pharmaceutically acceptable carrier.
16. Use of the expression vector of claim 2 or the reagent of claim 14 to produce a medicament for modulating the activity of a sphingosine kinase-like protein in a disease.
- 25
17. Use of claim 16 wherein the disease is cancer, asthma, allergy, an autoimmune disease or a central or peripheral nervous system disorder.
18. A cDNA encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11.
- 30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 86 -

19. The cDNA of claim 18 which comprises SEQ ID NO: 1 or 9.
20. The cDNA of claim 18 which consists of SEQ ID NO: 1 or 9.
- 5 21. An expression vector comprising a polynucleotide which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11.
- 10 22. The expression vector of claim 21 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO: 1 or 9.
23. A host cell comprising an expression vector which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11.
- 15 24. The host cell of claim 23 wherein the polynucleotide consists of SEQ ID NO: 1 or 9.
25. A purified polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11.
- 20 26. The purified polypeptide of claim 25 which consists of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11.
- 25 27. A fusion protein comprising a polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11.
28. A method of producing a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11, comprising the steps of:
- 30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 87 -

culturing a host cell comprising an expression vector which encodes the polypeptide under conditions whereby the polypeptide is expressed; and

isolating the polypeptide.

5

29. The method of claim 28 wherein the expression vector comprises SEQ ID NO: 1 or 9.

30. A method of detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11, comprising the steps of:

10

hybridizing a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1 or 9 to nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and

15

detecting the hybridization complex.

31. The method of claim 30 further comprising the step of amplifying the nucleic acid material before the step of hybridizing.

20

32. A kit for detecting a coding sequence for a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11, comprising:

25

a polynucleotide comprising 11 contiguous nucleotides of SEQ ID NO: 1 or 9; and
instructions for the method of claim 30.

33. A method of detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11, comprising the steps of:

30

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 88 -

contacting a biological sample with a reagent that specifically binds to the polypeptide to form a reagent-polypeptide complex; and

detecting the reagent-polypeptide complex.

5

34. The method of claim 33 wherein the reagent is an antibody.

35. A kit for detecting a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11, comprising:

10

an antibody which specifically binds to the polypeptide; and

instructions for the method of claim 33.

15

36. A method of screening for agents which can modulate the activity of a human sphingosine kinase-like protein, comprising the steps of:

20

contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11; and

25

detecting binding of the test compound to the polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential agent for regulating activity of the human sphingosine kinase-like protein.

37. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell.

30

38. The method of claim 36 wherein the cell is *in vitro*.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 89 -

39. The method of claim 36 wherein the step of contacting is in a cell-free system.
40. The method of claim 36 wherein the polypeptide comprises a detectable label.
- 5 41. The method of claim 36 wherein the test compound comprises a detectable label.
42. The method of claim 36 wherein the test compound displaces a labeled ligand which is bound to the polypeptide.
- 10 43. The method of claim 36 wherein the polypeptide is bound to a solid support.
44. The method of claim 36 wherein the test compound is bound to a solid support.
- 15 45. A method of screening for agents which modulate an activity of a human sphingosine kinase-like protein, comprising the steps of:
- 20 contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (1) amino acid sequences which are at least about 50% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11 and (2) the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11; and
- 25 detecting an activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for increasing the activity of the human sphingosine kinase-like protein, and wherein a test compound which decreases the activity of the polypeptide is
- 30 identified as a potential agent for decreasing the activity of the human sphingosine kinase-like protein.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 90 -

46. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell.
47. The method of claim 45 wherein the cell is *in vitro*.
- 5
48. The method of claim 45 wherein the step of contacting is in a cell-free system.
- 10
49. A method of screening for agents which modulate an activity of a human sphingosine kinase-like protein, comprising the steps of:
- contacting a test compound with a product encoded by a polynucleotide which comprises the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or 9; and
- 15
- detecting binding of the test compound to the product, wherein a test compound which binds to the product is identified as a potential agent for regulating the activity of the human sphingosine kinase-like protein.
- 20
50. The method of claim 49 wherein the product is a polypeptide.
51. The method of claim 49 wherein the product is RNA.
- 25
52. A method of reducing activity of a human sphingosine kinase-like protein, comprising the step of:
- contacting a cell with a reagent which specifically binds to a product encoded by a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or 9, whereby the activity of a human sphingosine kinase-like protein is reduced.
- 30
53. The method of claim 52 wherein the product is a polypeptide.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 91 -

54. The method of claim 53 wherein the reagent is an antibody.
55. The method of claim 52 wherein the product is RNA.
56. The method of claim 55 wherein the reagent is an antisense oligonucleotide.
57. The method of claim 56 wherein the reagent is a ribozyme.
58. The method of claim 52 wherein the cell is *in vitro*.
59. The method of claim 52 wherein the cell is *in vivo*.
60. A pharmaceutical composition, comprising:
a reagent which specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11; and
a pharmaceutically acceptable carrier.
61. The pharmaceutical composition of claim 60 wherein the reagent is an antibody.
62. A pharmaceutical composition, comprising:
a reagent which specifically binds to a product of a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or 9; and
a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 92 -

63. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is a ribozyme.
- 5 64. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an antisense oligonucleotide.
65. The pharmaceutical composition of claim 62 wherein the reagent is an antibody.
- 10 66. A pharmaceutical composition, comprising:

an expression vector encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2, 10 or 11; and

15 a pharmaceutically acceptable carrier.
67. The pharmaceutical composition of claim 66 wherein the expression vector comprises SEQ ID NO: 1 or 9.
- 20 68. A method of treating a sphingosine kinase-like protein dysfunction related disease, wherein the disease is selected from cancer, asthma, allergy, an autoimmune disease or a central or peripheral nervous system disorder comprising the step of:

25 administering to a patient in need thereof a therapeutically effective dose of a reagent that modulates a function of a human sphingosine kinase-like protein, whereby symptoms of the sphingosine kinase-like protein dysfunction related disease are ameliorated.
- 30 69. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 36.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 93 -

70. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 45.
- 5 71. The method of claim 68 wherein the reagent is identified by the method of claim 49.

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 1/10 -

Fig. 1

accaaagcatttactggatattatcaaccggttggaggaaaaggacaag
 gcaagcggatataatgaaagaaaagtggcaccactgttcaccttagcctcc
 atcaccactgacatcatcggttaacaaattctatgttaactatgtagaagt
 aattactgaacatgctaatacaggccaaggagactctgtatgagattaaca
 tagacaaatacgaaggcatcgtctgtgtcggcggagatggatatgttcagc
 gaggtgctgcacggctctgattgggaggacgcagaggagcggcgggtcga
 ccagaaccacccccgggctgtgctggccccagtagcctccggattggaa
 tcatccccgagggtcaacggactgctgtgttactccaacggggcacc
 agcgacgcagaaaacctcggcgtgcatatcgttgtggggactcgtggc
 catggatgtgtcctcagtcaccacaacagcacactccttcgctactcgg
 tgcctcgtgggctacggcttctacggggacatcatcaaggacagtgag
 aagaaacgggtgggtgggtcttgccagatcagacttttcagggttaaaagac
 ctctcctcctccaccactgctatgaaggacagtgctcctcctcctgcac
 aacacacgggtgggatctccaaggataggaagccctgcccggcaggatgc
 ttgtttgaggcaagcaagcagcagctggaggaggagcagaagaaagc
 actgtatgggttggaaactgcccggagcgtggaggagtggcaagtctgtct
 gtgggaagtcttgccatcaatgccacaaacatgtcctgtgctgtcgc
 cggagccccagggtcctcctcccggctgccacttgggagacgggtcttc
 tgacctcatcctcatccggaatgctcaggttcaatctctgagatttc
 tcatcaggcacaccaaccagcaggaccag

Fig. 2

PKHLLVFINP FGGKGQKRI YERKVAPLFT LASITTDIIG
 NKFYVNYVEV ITEHANQAKE TLYEINIDKY DGIVCVGGDG
 MFSEVLHGLI GRTQRSAGVD QNHPRAVLVP SSLRIGIIPA
 GSTDCVCYST VGTSDAETSA LHIVVGDLSA MDVSSVHHNS
 TLLRYSVSLI GYGFYGDIIK DSEKKRWLGL ARYDFSGLKT
 FLSHHCYEGT VSFLPAQHTV GSPRDRKPCR AGCFVCRQSK
 QQLEEEQKKA LYGLEAAEDV EEWQVVCCKF LAINATNMSC
 ACRRSPRGLS PAAHLGDGSS DLLLIRKCSR FNFLRFLIRH TNQQDQ

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 2/10 -

Fig. 3

MAPPPPLAASTPLLHGEFGSYPARGPRFALTLTSQALHIQRLRPKPEARP
 RGGLVPLAEVSGCCTLRSRSPSDSAAAYFCIYTYPRGRRGARRRATRTFRAD
 GAATYEENRAEAQRWATALTCLLRGLPLPGDGEITPDLLPRPPRLLLLVNP
 FGGRGLAWQCKNHVLPMISEAGLSFNLIQTERQNHARELVQGLSLSSEWDG
 IYTVSGDGLLHEVLNGLLDRPDWEAVKMPVGIILPCGSGNALAGAVNQHGG
 FEPALGLDLLLNCSSLRCRGGGHPDLLSVTLASGSRCSFSLVAVGFVSD
 VDIQSERFRALGSARFTLGTVLGLATLHTYRGRLSYLPAVPEASPTPAHS
 LPRAKSELTLTPDPAPPMAHSPLHRSVSDLPLPLPALASPGSEPELPIL
 SLNGGPELAGDWGGAGDAPLSPDLLSSPPGSPKAAHSPVSEGAPVIPP
 SSGLPLPTPDARVFASTCGPPDHLPLPLGTPLPPDWWTLRQDFVLMIAISP
 SHLGADLVAAPHARFDDGLVHLCWVRSGISRAALLRFLAMERGSFSLGC
 PQLGYAAARAFRLEPLTPRGVLTVDGEQVEYGPLQAQMHPGIGTLLTGPPP
 CPGREP

Fig. 4

caccaggggtatgttcagcgaggtgctgcacggtctgattgggaggacgca
 gaggagcgcggggtcgaccagaaacccccgggctgtgctggtccccag
 tagcctccggatggaaatcatcccgacgggtcaacggactgctgtgtta
 ctcccacgtgggacaccagcgacgagaaacctcggcgctgcatatcgttgt
 tggggactcgctggcactggatgtgctcctcagccaccacaacagcacact
 ccttcgctactcgtgtccctgctgggctacggcttctacggggacatcat
 caaggacagtgagaagaacggtggttgggtcttgccagatagactttc
 aggtttaaagaccttctctcccaccactgctatgaaggacagtgctcct
 cctccctgcacaaacacaggtgggatctccaagggataggaagccctgccc
 ggcaagatgctttgg

Fig. 5

tcaccactgacatcatcggttactgaacatgctantcaggccanggagactc
 tgtatgagattaacatagacaaatcgcacggcatcgtctgtgtcggcggag
 atggatgttcagcgaggtgctgcacggtctgattgggaggacgcagagga
 gcgccccgggtcgaccagaaccacccccgggctgtgctggtccccagtagcc
 tccggattggaaatcatcccgacgggtcaaacggactgcgtgtnttactcca
 ccggtgggancagcgacgcagaaacctcggcgctgcataatcgttgttgggg
 actcgtggccatggatgtgtcc

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 3/10 -

Fig. 6

gtttaaagaccttcctctcccaccactgctatgaagggacagtgtccttcc
tccctgcacaacacacgggtgggatctccaagggataggaagcctgcccggg
caggatgctttgtttgcaggcaaaagcaagcagcagctggaggaggagcaga
agaaagcactgtat

Fig. 7

gggactcgcctggccatggatgtgtcctcagtcaccacaacagcactcc
ttcgctactcogtgcctgctgggctacggcttctacggggacatcatca
aggacagtgagaagaaacgggtgggttgggtccttccagatacgactttcag

Fig. 8

Cacgagggcgcctaaccggtccggcgcccctcggcgtccgcgccccagcc
tggcggacgagcccggcggcggagatggggcgacggggcggcggagccg
ctggcaatccgtgctgtgggtgaagcagcagcgcctgcgcccgtgagcctggag
cccgcggggctctgctgcgctggtggcggagcccggggcccggagccggc
gccccggcgggatgcctgctctgtgcctgtatctgagatcatcgccgtt
gaggaaacagacgttcacgggaaacatcaaggcagtggaatggcagaaa
atggaaaagccttacgctttacagttcactgtgtaagagagcacgacgg
caccgctggaagtggcgcagggtgactttctgggtgtccagaggagcagctg
tgtcacttgtggctgcagaccctcgggagatgctggagaagctgacgtcc
agaccaaacatttactggtatttatcaaccgcttggaggaaaaggacaa
ggcaagcgggatatatgaaagaaaagtggcaccactgttca

Fig. 9

CACGAGGCCGCTAACGGTCCGGCGCCCTCGGCGTCCGGCGCCCCCAGC
 CTGGCGGACGAGCCCGGGCGGAGATGGGGGCGACGGGGGCGGGGAGC
 CGCTGCAATCCGTGCTGTGGTGAAGCAGCAGCGCTGCGCCGTGAGCCTG
 GAGCCCGCGGGCTCTGCTGCGCTGGTGGCGGAGCCCGGGCCCGGAGC
 CGGCGCCCCGGCGGATGCTGCTCTGTGCTGTATCTGAGATCATCG
 CCGTTGAGGAAACAGACGTTACCGGAAACATCAAGGCAGTGGAAAATGG
 CAGAAAATGGAAAAGCCTTACGCTTTTACAGTTCACTGTGTAAGAGAGC
 AGCACGGCACCGCTGGAAGTGGGGCAGGTGACTTTCTGGTGTCCAGAGG
 AGCAGCTGTGTCACTTGTGGTGCAGACCCTGCGGGAGATGCTGGAGAG
 CTGACCTCCAGACCAGCAATTTACTGGTATTTTCAACCCGTTTGGAGG
 AAAAGGACAAGGCAAGCGGATATATGAAAAGAAAAGTGGCACCCTGTTCA
 CCTAGCCCTCCATCACCCTGACATCATCGTTACTGAACATGCTAATCAG
 GCACAGGAGACTCTGTATGAGATTAACATAGACAAAATACGACGGCATCGT
 CTGTGTCCGGGAGATGGTATGTTGAGGAGGTGCTGCACGGTCTGATTG
 GGAGGACGAGAGGAGCGCCGGGTCGACCAGAACACCCCGGGCTGTG
 CTGGTCCCGAGTAGCCTCCGATTGGAATCATTCCCGCAGGGTCAACGGA
 CTGGGTGTGTTTACCCACCGTGGGACAGCGACGAGAAAACCTCGGCGC
 TGCAATACGTTGTGGGGACTCGCTGGCCATGGATGTCTCCTCAGTCCAC
 CACAACAGCACACTCCTTCGCTACTCCGTGTCCCTGCTGGGCTACGGCTT
 CTACGGGACATCATCAAGGACAGTGAAGAAGAACGGTGGTGGGTCTTG
 CCAGATACGACTTTTTCAGGTTAAAGACCTTCTCTCCACCACTGCTAT
 GAAGGACAGTGTCTTCTCCCTGCAACAACACCGGTGGGATCTCCAAG
 GGATAGGAAGCCCTGCGGGCAGGATGCTTTGTTTGCAGGCAAGCAAGC
 AGCAGCTGGAGGAGGAGCAGAAGAAGCACTGTATGGTTTGGAAAGTGGC
 GAGGACGTGGAGGAGTGGCAAGTCTGTGGGAAGTTTCTGGCCATCAA
 TGCCACAACATGTCCTGTGCTTGTGCGCGGAGCCCAGGGGCTCTCCC
 CGGCTGCCACTTGGGAGACGGGTCTTTCGACCTCATCTCATCCGGAAA
 TGCTCCAGGTTCAATTTTCTGAGATTTCTCATCAGGCACACCAACCAGCA
 GGACAGTTTGACTTCACTTTTGTGAAAGTTTATCGCGTCAAGAAATTC
 AGTTTACGTGCAAGCACATGGAGGATGAGGACAGCGACCTCAAGGAGGGG
 GGAAGAAGCGCTTTGGGCAATTGACAGCAGCCACCCCTCCTGCTGCTG
 CACCGTCTCCAACAGCTCCTGGAACGCGACGGGGAGGTCTGACACAGCC
 CTGCCATCGAGGTCAGAGTCCACTGCCAGCTGGTTGACTCTTTGACGGA
 GGAATTGAAGAGAAATCCGAAGCCAGACTCACACAGCTGAGAAGCCGGCGT
 CCTGCTCTGAACTGGGAAAGTGTGAAAATATTTAAGATAATTTATTACA
 GACCAATTTGTTGATATATACATTTAAATGTAGAAATTTATTTTGGATA
 GTAAATCTTGATTTTGAAGAAAACCCCTTTTGTCAACAAATTTGTGTA
 ATATTTGGCATTTCAGTCTGTACGCATCTGCGGGTTGCAGCCACGCC
 GCTTACTCTCAGCGGATGCAGCTGCTCACTTGGGGCAGTGGCTCTTAG
 GTTTTAAACGATGTCAAAGTGTAGTTTAAAGAAATGGCCGTTAGTGGCTC
 TATTGCAATAATGTTAGGGACATTATATGATTTCCACGAGGTACACCA
 TCTGGGCTGAGGTAGCAGTGGTCACTTTGATCCACTTGCAGGACTTA
 TTCTGTAAACGGTTTGTGGCCAGTTTGGGAAGTGGTTGATTTCTTTTGC
 CTTCAATTCACCTTCTCTTCTGTTTACGGTTAGGACATCGCTGCTTATC

Fig. 9 (continued)

CTTACAATACTGTGCAACTGCAATGCAACGTGGCCCTGCTTCAGGTGATC
 CGCGGGAGGGGCTCCACGCCAGCGCCGGGAAGGCTGCTGGGGCCTCCAC
 ACCTGCCTCATCACGGCGGGGAGGCTACGACAATCCGGCTGGGAGCATGA
 CCTTGGCGTCTGTCTGGGAGCACAGATGATAAGCTCTGGAAAGCTGGCAG
 TGTGTAAGCACTGGCAAGTTTGTACTGTAAATGTCAAATACCAATG
 CTTTATATCGACGCGAAGTGTAAACACAGCCGGGCTTGGGGCAGTCAG
 GAGGAAGCTGGCCATCCGTGGAGGAGGGCCGGTCTGGACTCCCGCAGG
 ACTCCTCTGATGACAGGGCCTGAAGTCTGTACACGTGGTCCAGATTGTCC
 TTGTCTTTCTTCACTGAGTCTCTATATTTATTGAACATCTGTCTCT
 TTTAAGCCAGAGTAGTGTAAACTGCGTCTCGGATGTCTGTCTTTGCGCTC
 GAAGCCACGATGGATCGCTGGTTTCTCTGACGCGGAGGGCTCCGGCGA
 CCAGAGGATTTCTCCCGGAAGGCATTCCTGCCCGCTCCCGGGGACCC
 CTCATTTGAGTACTACGTCTTGTAGTGTATCCGTGCCACGTAGA
 TGATGCTCTAACGTAGTTTGTGTAATATGAGAATATGCGGCTTAAA
 CTTTGATCTGTAAGGAGCGGGCCGTGGCGTTTGGAGCACGCTGTAGAC
 ACCGTTCTCATGCTGCCGGTGGGTTTTGCAGAAGCTCCCTTAGTGATT
 TCATGTTTAAACAGGCAGCATCCATTTTTCAGAAATTTCTGGCATTGATTTA
 TATTTTGAAGCATAACAGGAACTTCTCGTTTCCCTCGTTAGCCCCACCCA
 GATCAGGTGAAAGGGCAGCTTAAATGGTGGTTTTATGACCACATTATC
 AGAGAGCACTGTGCAAGCCAAATGCTTCAATAATGAATGAAAATTTCTGGG
 TGTAAAGAGTAAATATGCCCTGGCTCTTCTACCAATGTTTGTCTCTGGT
 TGGAAAGAAACCAAAGATTTAAGACGGGCTGCTCTTCCAGACTGGCTGTG
 CCTGCTGTGCCAGCAACCTGTGACGCGGAGTGTGCTGGTGTACAG
 CCAGGAGGCTGTGGCTGCTGTGGGCCCTCTGGAATGTGCTCTCCACAAA
 GPTTCCCCAAAAGGTTCTCTAAGCCTTTATTGTCCCTGGTAAATGTTTC
 CCGGCTGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCC
 GAGGCGGGTGGATCACCTAAGGTGAGGAGTTTGGATCAGCCTCCCAAC
 ATGGTGAAACCTCGTCTCTACTAAAAATACCAACTTAGCCAGTCTTGT
 GCGCACGCTGTAATCTCAGCTACTAGGGAGCTGAGGAGGAGATCG
 CTTGAACCCAAAGAAAGAGGTGGAGGTTGGCGTGAGCAAGATTGGCCAC
 TGCACTCCAGCCTGGGCAAAACAGAGGGAGACTCCATCGCCCCCCCCAAC
 AAAAAAAAAAGTTTCCCATACACTGGCTGCCCAAAACCCACTAACAAAT
 TTTAGCAAAACAGTCCAGGCCAAAGAGGAAGCATTTCATGTTCAATAAGA
 AACCCAGCCATCCGCATGGCTGGTTCTGAGTGGCTCTGGTGATACTCT
 CCAGCCACCTGTGACATTGAGAACTCAGACCTCGGACTGTGTTGCG
 GTAACCGTGTGTCTGACACCTGCCAGCAGCCCTTGTCTATCTGCGCGCAGG
 ATGGGGGTGACTGCCAGACATCCCGCTAGATAGGCTCTGATTTCGGGG
 GCAGCCTTTCAGATGCGGCAGACATACACACCTGTACTTTAGAGTTTAA
 AGGAAAAAAATCAGAAGTGTGGTTAGATAGTAAAACTTAGGATAAC
 TTAGAAAGGCTAGTTTGTAGCTTCTTTGTGGCTCCCTGGTGCAAAACAAT
 TAGCAGTTATGCAATGGACCTGATTCTAGTTTATTCTAATTAAGAAAGTGA
 GGCCGAGTTTGAATTCGTTCTGAATACAACTTTAGTAACCTGGGAAAGT
 CTGAGTGAAAGGATGGCCTCATTCTCTTCTAATCTGTGCTGGTTCAAGA
 TTAGAAAATGGCATTATTTGATCTGAAATGTTTGAAGACACGAATAAA

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 6/10 -

GTTACTTGGGCAG

Fig. 10

MGATGAAEPLQSVLWVKQORCAVSLPARALLRWWRSPGPGAGAPGADAC
 SVPVSEI IAVEETDVHGKHQSGKWKQMEKPYAFTVHCVKRARRRHWKWA
 QVTFWCPEEQQLCHLWLQTLREMLEKLTSRPKHLLVF INPFGGKGQKRIY
 ERKVAPLFTLASITTDI IVTEHANQAKETLYEINIDKYDGI VCVGGDGMF
 SEVLHGLIGRTQRSAGVDQNHPRAVLVPSSLRIGI I PAGSTDCVYSTVG
 TSDAETSALHIVVGD SLAMDVSSVHNS TLLRYSV SLLGYGFYGDIIKDS
 EKRWLGLARYDFSG LKTF LSHHCYEGTVSFLPAQHTVGS PRDRKPCRAG
 CFVCRQSKQLEEEQKALYGLEAAEDVEEWQVVCCKFLA INATNMSCAC
 RRSRGLSPAHLGDGSSDLILIRKCSR FNFLRFLIRHTNQDQDFDFTFV
 EVYRVKFKQFTSKHMEDESDLKEGGKRF GHICSSHPSCCCTVSNSSWN
 CDGEVLHSPAIEVRVHCQLVRLFARGIEENPKPDSHS

Fig. 11

HEAANGPAPLGVRRAPPARTSPAEMGATGAAEPLQSVLWVKQORCAVSL
 PARALLRWWRSPGPGAGAPGADAC SVPVSEI IAVEETDVHGKHQSGKWK
 QMEKPYAFTVHCVKRARRRHWKWAQVTFWCPEEQQLCHLWLQTLREMLEK
 LTSRPHLLVF INPFGGKGQKRIY ERKVAPLFTLASITTDI IVTEHANQ
 AKETLYEINIDKYDGI VCVGGDGMFSEVLHGLIGRTQRSAGVDQNHPRAV
 LVPSSLRIGI I PAGSTDCVYSTVGTSDAETSALHIVVGD SLAMDVSSVH
 HNSTLLRYSV SLLGYGFYGDIIKDS EKRWLGLARYDFSG LKTF LSHHCY
 EGTV SFLPAQHTVGS PRDRKPCRAGCFVCRQSKQLEEEQKALYGLEAA
 EDVEEWQVVCCKFLA INATNMSCACRRSRGLSPAHLGDGSSDLILIRK
 CSR FNFLRFLIRHTNQDQDFDFTFVEVYRVKFKQFTSKHMEDESDLKEG
 GKRF GHICSSHPSCCCTVSNSSWNCDGEVLHSPAIEVRVHCQLVRLFAR
 GIEENPKPDSHS

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 8/10 -

Fig. 13

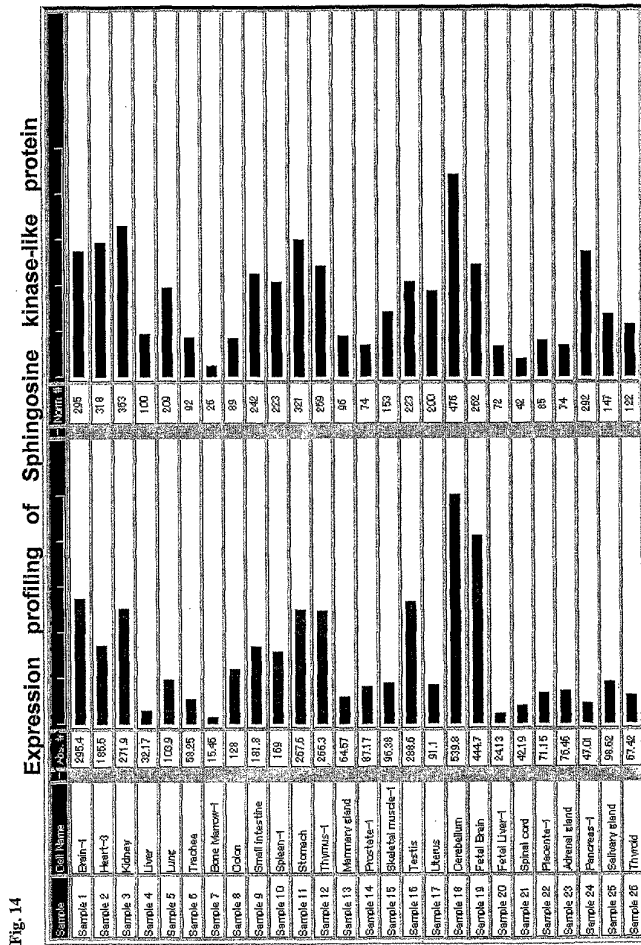
PKHLIVFINP FGGRGQGRRI YERKVAPLFT LASITTDLIG NKFYVNVYVEV ITEHANOAKE
TLYELNIDKY DGIVCVGGDG MFSEVLHGLI GRTQRSAGVD QNHPRAVLVP SSLRIGIIPA
GSTDCVCYST VGTSDAETSA LHIVVGDLSA MDVSVVHNS TLLRYSVSLI GYGFYGDIIK
DSEKRWLGL ARYDFSGLKT FLSHHCYBGT VSFLPAQHTV GSPDRRKEPCR AGCFVCRQSK
QQLBEEQKKA LYGLEAAEDV EEWQVVCCKF LAINATNMSC ACRRSPRGLS PAHLGDGSS
DLILIRKCSR FNFIRFLIRH TNQQDQ

Diacylglycerol kinase catalytic domain in bold

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 9/10 -

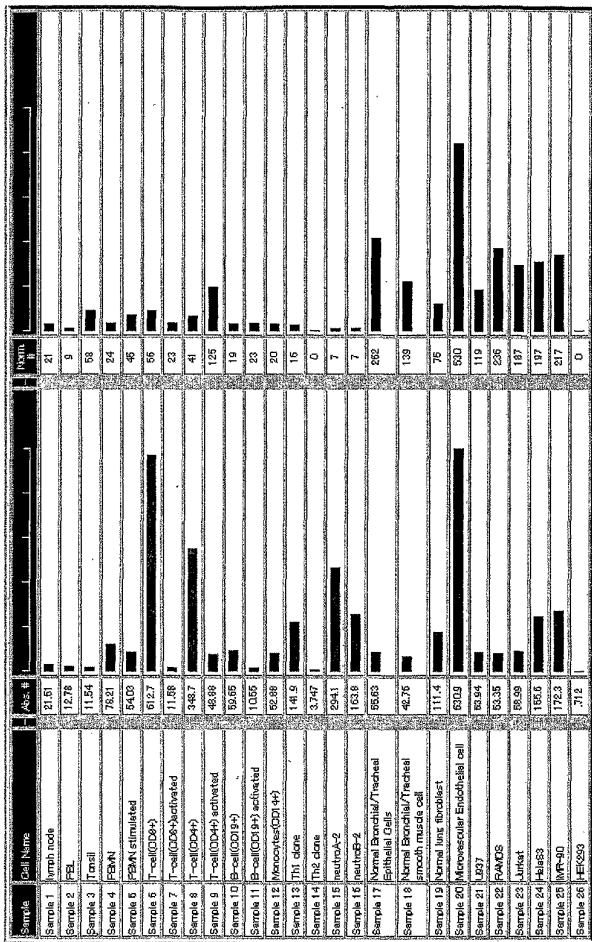


WO 02/28906

PCT/EP01/11516

- 10/10 -

Fig. 15 Expression profiling of Spliceosome kinase-like protein mRNA. blood/luna screen



WO 02/28906

PCT/EP01/11516

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF HUMAN SPHINGOSINE KINASE-LIKE PROTEIN

<130> LI0160 Foreign Countries

<150> US 60/238,005
<151> 2000-10-06

<150> US 60/XXX,XXX
<151> 2001-08-23

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 979
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
 accaaagcat ttactggtat ttatcaacc gtttggagga aaaggacaag gcaagoggat 60
 atatgaaaga aaagtggcac cactgttcac cttagcotcc atcaccactg acatcatogg 120
 taacaaattc tatgttaact atgtagaagt aattaactgaa catgctaate aggccaagga 180
 gactctgtat gagattaaca tagacaaata cgaaggcacc gtctgtgtcg gcggagatgg 240
 tatgttoagc gaggtgctgc acggtotgat tggaggagcg cagaggagcg cgggggtoga 300
 ccagaacoac ccccggtctg tctgggtccc cagtagctcc oggattggaa tcattccccc 360
 agggtaaacg gactgcgtgt gttactccac cgtgggcacc agogacgacg aaacctcggc 420
 gctgcataat gttgttgggg actogotggc catggatgtg tctcagtc accacaacag 480
 cscactcctt cgtactcccg tctccctgct gggctacggc ttctcgggg acatcatcaa 540
 ggacagtgag aagaacggt ggttgggtct tgcagatac gacttttcag gtttaaagac 600
 ottcctctcc caocactgct atgaaggac agtctcttc ctccctgca aacacacggt 660
 gggatctoca agggatagga agccctgccc ggcaggatgc tttgtttgca ggcaagcaa 720
 gcagcagctg gaggaggagc agaagaaagc actgtatggt ttggaagctg cggaggacgt 780
 ggaggagtgg caagtgtct gtgggaagt tctggccatc aatgccaca acatgtctg 840
 tgotgtgoc cggagcccca gggcctctc cccggtgac cacttgggag acgggtctc 900
 tgaactcacc ctcatccgga aatgotccag gttaatttt ctgagatttc tcatcaggca 960
 caacaacoag caggacoag 979

<210> 2
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

<400> 2

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

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

Gln Gln Leu Glu Glu Gln Lys Lys Ala Leu Tyr Gly Leu Glu Ala
 245 250 255

Ala Glu Asp Val Glu Glu Trp Gln Val Val Cys Gly Lys Phe Leu Ala
 260 265 270

Ile Asn Ala Thr Asn Met Ser Cys Ala Cys Arg Arg Ser Pro Arg Gly
 275 280 285

Leu Ser Pro Ala Ala His Leu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Leu Ile Leu
 290 295 300

Ile Arg Lys Cys Ser Arg Phe Asn Phe Leu Arg Phe Leu Ile Arg His
 305 310 315 320

Thr Asn Gln Gln Asp Gln
 325

<210> 3
 <211> 618
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu Leu His
 1 5 10 15

Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr
 20 25 30

Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu
 35 40 45

Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser Gly Cys
 50 55 60

Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr Phe Cys
 65 70 75 80

Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg Ala Thr
 85 90 95

Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala
 100 105 110

Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Leu
 115 120 125

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro Arg Pro
130 135 140

Pro Arg Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly
165 170 175

Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu
180 185 190

Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val Thr Val
195 200 205

Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg
210 215 220

Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu Pro Cys
225 230 235 240

Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly Gly Phe
245 250 255

Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu
260 265 270

Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala
275 280 285

Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Val
290 295 300

Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala
305 310 315 320

Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr
325 330 335

Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala Ser Pro
340 345 350

Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr Leu Thr
355 360 365

Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg Ser Val
370 375 380

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser Pro Gly
385 390 395 400

Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu
405 410 415

Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp
420 425 430

Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu His Ser
435 440 445

Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro
450 455 460

Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly Pro Pro
465 470 475 480

Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp Trp Val
485 490 495

Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro Ser His
500 505 510

Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
515 520 525

Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
530 535 540

Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser Leu Gly
545 550 555 560

Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
565 570 575

Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val Glu Tyr
580 585 590

Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu Leu Thr
595 600 605

Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
610 615

<210> 4
<211> 474

WO 02/28906 PCT/EP01/11516

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
caogaggggt atgttcagcg aggtgctgca cggctctgatt gggaggaocg agaggagcgc 60
eggggtogac cagaaccaoc ccgggctgt gctggctccc agtagcctcc ggattggaat 120
cattccocga ggytcaacgg actgcgtgtg ttaotcaoc gtgggcacca gcgacgcaga 180
aacctoggcg ctgcatacog ttgttgggga ctgctggcc atggatgtgt cctcagtcga 240
ccacaacago acactcotto gctaotcogt gtccctgctg ggtacggct tctaogggga 300
catacacaag gacagtgaga agaacgggtg gttgggtott gccagatacg acttttcagg 360
tttaaagaco ttocctctccc acoactgcta tgaagggaca gtgtccttcc tccctgcaca 420
acacaoggtg ggatctccaa gggataggaa gcctgcocgg gcaagatgct ttgg 474

<210> 5
<211> 329
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> n=a, c, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (43)..(43)
<223> n=a, c, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (247)..(247)
<223> n=a, c, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (265)..(265)
<223> n=a, c, g or t

<400> 5
tcaccaotga catcatcgtt actgaacatg ctantcagge canggagact ctgtatgaga 60
ttaacataga caaatacagc ggcacgtct gtgtcggcgg agatggtatg ttcagcgagg 120
tgcgcacgg totgattggy aggaogcaga ggagocccgg ggtogaccag aaccaccccc 180
ggcgtgtgt ggtccccagt agctccogga ttggaatcat tccogcaggt caaacggact 240
gcgtgtntta ctccacogtg ggcancagcg acgcagaaac ctggcgcctg catatcgttg 300
ttggggactc gctggcocatg gatgtgtcc 329

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

```

<210> 6
<211> 167
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gtttaaagac attcototoc caccactgct atgaagggac agtgtccttc etccotgca 60
aacacacggt gggatctcca aggatagga agcctgccc ggcaggatgc tttgtttgca 120
ggcaaaacaa gcagcagctg gaggaggagc agaagaaagc actgtat 167

<210> 7
<211> 153
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gggactogct ggcocatggat gtgtcctcag tccaccacaa cagcacactc ettcgtact 60
ccgtgtccct gctgggctac ggotctacg gggacatcat caaggacagt gagaagaaa 120
ggtggttggg tottgocaga taogactttt cag 153

<210> 8
<211> 550
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
cacgagcccg ctaaaggctc ggcccccctc ggcgtccgag cgcctccagc ctggcggagc 60
agcccgccgg cggagatggg ggcgacgggg ggcgaggagc cgtgcaato cgtgctgtgg 120
gtgaagcagc agcgtctgoc cgtgagcctg gagcccgocg gggctctgct gcgctgttgg 180
cggagccocg ggcocggagc cgggocccoc ggcgaggatg cctgtctgtg gctgttatot 240
gagatcctcg ccgttgagga aacagacgtt caccggaaac atcaaggcag tggaaaatgg 300
cagaaaatgg asaagcotta cgtttttaca gttcactgtg taaagagagc acgacggcag 360
cgtgggaagt gggcgcaggt gaotttctgg tgtocagagg agcagctgtg tcaactgttg 420
ctgcagacc tgcgggagat gctggagaag ctgacgtcca gaccaaaagca tttactgtta 480
tttatcaacc cgtttggagg aaaaggacaa ggcaagcgga tatatgaaag aaaagtggca 540
ccactgttca 550

<210> 9
<211> 4413
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (76)..(1689)
<223>

```

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

```

<400> 9
caagagcccg ctaaaggctcc ggcgcccctc ggogtcogcg cgcocccagc ctggcggacg 60
agccggcggc cggag atg ggg gcg acg ggg gog gog gag cgg ctg naa toc 111
      Met Gly Ala Thr Gly Ala Ala Glu Pro Leu Gln Ser
      1 5 10
gtg ctg tgg gtg aag cag cag cgc tgc gcc gtg agc ctg gag ccc gog 159
Val Leu Trp Val Iys Gln Gln Arg Cys Ala Val Ser Leu Glu Pro Ala
      15 20 25
cgg got ctg ctg cgc tgg tgg cgg agc cgg ggg ccc gga gcc ggc gcc 207
Arg Ala Leu Leu Arg Trp Trp Arg Ser Pro Gly Pro Gly Ala Gly Ala
      30 35 40
ccc ggc ggg gat gcc tgc tct gtg cct gta tct gag atc atc gcc gtt 255
Pro Gly Ala Asp Val His Ser Val Pro Val Ser Glu Ile Ile Ala Val
      45 50 55 60
gag gaa aca gac gtt cac ggg aaa cat caa ggc agt gga aaa tgg cag 303
Glu Glu Thr Asp Val His Gly Lys His Gln Gly Ser Gly Lys Trp Gln
      65 70 75
aaa atg gaa aag oct tac gct ttt aca gtt cac tgt gta aag aga gca 351
Lys Met Glu Lys Pro Tyr Ala Phe Thr Val His Cys Val Lys Arg Ala
      80 85 90
cga cgg cac cgc tgg aag tgg gcg cag gtg act ttc tgg tgt cca gag 399
Arg Arg His Arg Trp Lys Trp Ala Gln Val Thr Phe Trp Cys Pro Glu
      95 100 105
gag cag ctg tgt cac ttg tgg ctg cag acc ctg cgg gag atg ctg gag 447
Glu Gln Leu Cys His Leu Trp Leu Gln Thr Leu Arg Glu Met Leu Glu
      110 115 120
aag ctg acg toc aga cca aag cat tta ctg gta ttt atc aac cgg ttt 495
Lys Leu Thr Ser Arg Pro Lys His Leu Leu Val Phe Ile Asn Pro Phe
      125 130 135 140
gga gga aaa gga caa gcc aag cgg ata tat gaa aga aaa gtg gca cca 543
Gly Gly Lys Gly Gln Gly Lys Arg Ile Tyr Glu Arg Lys Val Ala Pro
      145 150 155
ctg ttc acc tta gcc tcc atc acc act gac atc atc gtt act gaa cat 591
Leu Phe Thr Leu Ala Ser Ile Thr Thr Asp Ile Ile Val Thr Glu His
      160 165 170
gct aat cag gcc aag gag act ctg tat gag att aac ata gac aaa tac 639
Ala Asn Gln Ala Lys Glu Thr Leu Tyr Glu Ile Asn Ile Asp Lys Tyr
      175 180 185
gac ggc atc gtc tgt gtc gcc gga gat ggt atg ttc agc gag gtg ctg 687
Asp Gly Ile Val Cys Val Gly Gly Asp Gly Met Phe Ser Glu Val Leu
      190 195 200
cac ggt ctg att ggg agg acg cag agg agc gcc ggg gtc gac cag aac 735
His Gly Leu Ile Gly Arg Thr Gln Arg Ser Ala Gly Val Asp Gln Asn
      205 210 215 220
cac ccc cgg got gtg ctg gtc ccc agt ago ctc cgg att gga atc att 783
His Pro Arg Ala Val Leu Val Pro Ser Ser Leu Arg Ile Gly Ile Ile

```

WO 02/28906	PCT/EP01/11516	
225	230	235
ccc gca ggg tca acg gac tgc gtg tgt tac toc acc gtg ggc acc agc Pro Ala Gly Ser Thr Asp Cys Val Cys Tyr Ser Thr Val Gly Thr Ser 240 245 250		831
gac gca gaa acc tgg ggg ctg cat atc gtt gtt ggg gac tgg ctg gcc Asp Ala Glu Thr Ser Ala Leu His Ile Val Val Gly Asp Ser Leu Ala 255 260 265		879
atg gat gtg tcc tca gtc cac cac aac agc sca ctc ott cgc tac tcc Met Asp Val Ser Ser Val His His Asn Ser Thr Leu Leu Arg Tyr Ser 270 275 280		927
gtg tcc ctg ctg ggc tac ggc ttc tac ggg gac atc atc aag gac agt Val Ser Leu Leu Gly Tyr Gly Phe Tyr Gly Asp Ile Ile Lys Asp Ser 285 290 295 300		975
gag aag aaa cgg tgg ttg ggt ott gcc aga tac gac ttt tca ggt tta Glu Lys Lys Arg Trp Leu Gly Leu Ala Arg Tyr Asp Phe Ser Gly Leu 305 310 315		1023
aag acc ttc ctc toc cac cac tgc tat gaa ggg aca gtg tcc ttc ctc Lys Thr Phe Leu Ser His His Cys Tyr Glu Gly Thr Val Ser Phe Leu 320 325 330		1071
cct gca caa cac acg gtg gga tot cca agg gat agg aag ccc tgc cgg Pro Ala Gln His Thr Val Gly Ser Pro Arg Asp Arg Lys Pro Cys Arg 335 340 345		1119
gca gga tgc ttt gtt tgc agg caa agc aag cag cag ctg gag gag gag Ala Gly Cys Phe Val Cys Arg Gln Ser Lys Gln Gln Leu Glu Glu Glu 350 355 360		1167
cag aag aaa gca ctg tat ggt ttg gaa gct gcg gag gac gtg gag gag Gln Lys Lys Ala Leu Tyr Gly Leu Glu Ala Ala Glu Asp Val Glu Glu 365 370 375 380		1215
tgg caa gtc gtc tgt ggg aag ttt ctg gcc atc aat gcc aca aac atg Trp Gln Val Val Cys Gly Lys Phe Leu Ala Ile Asn Ala Thr Asn Met 385 390 395		1263
toc tgt gct tgt cgc cgg agc ccc agg ggc ctc toc cgg gct gcc cac Ser Cys Ala Cys Arg Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser Pro Ala Ala His 400 405 410		1311
ttg gga gac ggg tot tot gac ctc atc ctc atc cgg aaa tgc tcc agg Leu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Leu Ile Leu Ile Arg Lys Cys Ser Arg 415 420 425		1359
ttc aat ttt ctg aga ttt ctc ato agy cac acc aac cag cag gac cag Phe Asn Phe Leu Arg Phe Leu Ile Arg His Thr Asn Gln Gln Asp Gln 430 435 440		1407
ttt gac ttc act ttt gtt gaa gtt tat cgc gtc aag aaa ttc cag ttt Phe Asp Phe Thr Phe Val Glu Val Tyr Arg Val Lys Lys Phe Gln Phe 445 450 455 460		1455
acg tgg aag cac atg gag gat gag gac agc gac ctc aag gag ggg ggg Thr Ser Lys His Met Glu Asp Glu Asp Ser Asp Leu Lys Glu Gly Gly 465 470 475		1503
aag aag cgc ttt ggg cac att tgc agc agc cac ccc toc tgc tgc tgc		1551

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

gtttttatgg acoacattat cagagagocac tgtgcaagcc saattggttoa ataatgaaatg 3189
 aaaattctgg gtgtaaagag taatatgccc ctggctcttt ctacooaatgt ttgctcctgg 3249
 ttggaagaaa acoaaagatt taagacgggc tgcctctcca gactggctgt gcctgcctgt 3309
 gccagcaac ctgtgcagcc gccagtgctc ctggtgtcac gccaggagcc tggggctgtct 3369
 gtgggcocto tggaaattgtg ctctcacaac agtttcccca aaagtttatt ctaagccttt 3429
 attgtccctg gtaaatgttt ccggctggg cgcgggtgct cagcctgta atccagcac 3489
 tttgggagcc ctaggggggt ggatccacta aggtcaggag tttgagata gcctgcccaa 3549
 catggtgaaa cctcgtctct actaaaaata cacaaactag ccagttctgt tggcgcacgc 3609
 ctgtaatctc agctactagg gacgtgagg caggagaatc gottgaaacc aagaagagg 3669
 tggaggttgc ggtgagccaa gattgcgcca ctgcactcca gcctgggcaa acagagggag 3729
 actcoctgc cccccccaa caaaaaaaaa agtttcccat acactggcct gccccaaac 3789
 ccactaaca ttttagoaaa acagtcagc ccaaaagga agcatttcat gttcaataag 3849
 aaaccagcc attccgcatg gctggttcct gactggctct ggtgatact tccagccacc 3909
 tctgacactt gagaatctca gacctggga ctgctgttgc ggtacgtgt gtctgacacc 3969
 tgcagcagc cctttgctat ctgcgcgag gatgggggtg actgcocaga cattccgct 4029
 agataggctc tgattccgg gccagccttt cagatgggc agacataca caoctgtact 4089
 ttagagtttt aagggaaaaa aaatcagaag tgcgtgttag atagtaaaa ottaggataa 4149
 ottagaagg ctagttag ctctcttctt ggtccctg tgcaaaaca ttagcagta 4209
 tgcactggac ctgattctag tttattotaa ttaagaagt aggcaggtt tgactctgt 4269
 octgaataca atcttgagta actgggaaag tctgagtgaa aggatggcct cattctctt 4329
 ctaatcttgc tggtttcaag attagaaat gccattttt gatctgaaat gtttgagaag 4389
 acacgaataa agttacttgg gcag 4413

<210> 10
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Ala Thr Gly Ala Ala Glu Pro Leu Gln Ser Val Leu Trp Val
1 5 10 15

Lys Gln Gln Arg Cys Ala Val Ser Leu Glu Pro Ala Arg Ala Leu Leu
20 25 30

Arg Trp Trp Arg Ser Pro Gly Pro Gly Ala Gly Ala Pro Gly Ala Asp
35 40 45

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

Ala Cys Ser Val Pro Val Ser Glu Ile Ile Ala Val Glu Glu Thr Asp
50 55 60

Val His Gly Lys His Gln Gly Ser Gly Lys Trp Gln Lys Met Glu Lys
65 70 75 80

Pro Tyr Ala Phe Thr Val His Cys Val Lys Arg Ala Arg Arg His Arg
85 90 95

Trp Lys Trp Ala Gln Val Thr Phe Trp Cys Pro Glu Glu Gln Leu Cys
100 105 110

His Leu Trp Leu Gln Thr Leu Arg Glu Met Leu Glu Lys Leu Thr Ser
115 120 125

Arg Pro Lys His Leu Leu Val Phe Ile Asn Pro Phe Gly Gly Lys Gly
130 135 140

Gln Gly Lys Arg Ile Tyr Glu Arg Lys Val Ala Pro Leu Phe Thr Leu
145 150 155 160

Ala Ser Ile Thr Thr Asp Ile Ile Val Thr Glu His Ala Asn Gln Ala
165 170 175

Lys Glu Thr Leu Tyr Glu Ile Asn Ile Asp Lys Tyr Asp Gly Ile Val
180 185 190

Cys Val Gly Gly Asp Gly Met Phe Ser Glu Val Leu His Gly Leu Ile
195 200 205

Gly Arg Thr Gln Arg Ser Ala Gly Val Asp Gln Asn His Pro Arg Ala
210 215 220

Val Leu Val Pro Ser Ser Leu Arg Ile Gly Ile Ile Pro Ala Gly Ser
225 230 235 240

Thr Asp Cys Val Cys Tyr Ser Thr Val Gly Thr Ser Asp Ala Glu Thr
245 250 255

Ser Ala Leu His Ile Val Val Gly Asp Ser Leu Ala Met Asp Val Ser
260 265 270

Ser Val His His Asn Ser Thr Leu Leu Arg Tyr Ser Val Ser Leu Leu
275 280 285

Gly Tyr Gly Phe Tyr Gly Asp Ile Ile Lys Asp Ser Glu Lys Lys Arg
290 295 300

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

Trp Leu Gly Leu Ala Arg Tyr Asp Phe Ser Gly Leu Lys Thr Phe Leu
 305 310 315 320
 Ser His His Cys Tyr Glu Gly Thr Val Ser Phe Leu Pro Ala Gln His
 325 330 335
 Thr Val Gly Ser Pro Arg Asp Arg Lys Pro Cys Arg Ala Gly Cys Phe
 340 345 350
 Val Cys Arg Gln Ser Lys Gln Gln Leu Glu Glu Gln Lys Lys Ala
 355 360 365
 Leu Tyr Gly Leu Glu Ala Ala Glu Asp Val Glu Glu Trp Gln Val Val
 370 375 380
 Cys Gly Lys Phe Leu Ala Ile Asn Ala Thr Asn Met Ser Cys Ala Cys
 385 390 395 400
 Arg Arg Ser Pro Arg Gly Leu Ser Pro Ala Ala His Leu Gly Asp Gly
 405 410 415
 Ser Ser Asp Leu Ile Leu Ile Arg Lys Cys Ser Arg Phe Asn Phe Leu
 420 425 430
 Arg Phe Leu Ile Arg His Thr Asn Gln Gln Asp Gln Phe Asp Phe Thr
 435 440 445
 Phe Val Glu Val Tyr Arg Val Lys Lys Phe Gln Phe Thr Ser Lys His
 450 455 460
 Met Glu Asp Glu Asp Ser Asp Leu Lys Glu Gly Gly Lys Lys Arg Phe
 465 470 475 480
 Gly His Ile Cys Ser Ser His Pro Ser Cys Cys Thr Val Ser Asn
 485 490 495
 Ser Ser Trp Asn Cys Asp Gly Glu Val Leu His Ser Pro Ala Ile Glu
 500 505 510
 Val Arg Val His Cys Gln Leu Val Arg Leu Phe Ala Arg Gly Ile Glu
 515 520 525
 Glu Asn Pro Lys Pro Asp Ser His Ser
 530 535

<210> 11

WO 02/28906

PCT/EP01/11516

<211> 562

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

His Glu Ala Ala Asn Gly Pro Ala Pro Leu Gly Val Arg Ala Pro Pro
 1 5 10 15

Ala Trp Arg Thr Ser Pro Ala Ala Glu Met Gly Ala Thr Gly Ala Ala
 20 25 30

Glu Pro Leu Gln Ser Val Leu Trp Val Lys Gln Gln Arg Cys Ala Val
 35 40 45

Ser Leu Glu Pro Ala Arg Ala Leu Leu Arg Trp Trp Arg Ser Pro Gly
 50 55 60

Pro Gly Ala Gly Ala Pro Gly Ala Asp Ala Cys Ser Val Pro Val Ser
 65 70 75 80

Glu Ile Ile Ala Val Glu Glu Thr Asp Val His Gly Lys His Gln Gly
 85 90 95

Ser Gly Lys Trp Gln Lys Met Glu Lys Pro Tyr Ala Phe Thr Val His
 100 105 110

Cys Val Lys Arg Ala Arg Arg His Arg Trp Lys Trp Ala Gln Val Thr
 115 120 125

Phe Trp Cys Pro Glu Glu Gln Leu Cys His Leu Trp Leu Gln Thr Leu
 130 135 140

Arg Glu Met Leu Glu Lys Leu Thr Ser Arg Pro Lys His Leu Leu Val
 145 150 155 160

Phe Ile Asn Pro Phe Gly Gly Lys Gly Gln Gly Lys Arg Ile Tyr Glu
 165 170 175

Arg Lys Val Ala Pro Leu Phe Thr Leu Ala Ser Ile Thr Thr Asp Ile
 180 185 190

Ile Val Thr Glu His Ala Asn Gln Ala Lys Glu Thr Leu Tyr Glu Ile
 195 200 205

Asn Ile Asp Lys Tyr Asp Gly Ile Val Cys Val Gly Gly Asp Gly Met
 210 215 220

Phe Ser Glu Val Leu His Gly Leu Ile Gly Arg Thr Gln Arg Ser Ala

WO 02/28906 PCT/EP01/11516

225 230 235 240

Gly Val Asp Gln Asn His Pro Arg Ala Val Leu Val Pro Ser Ser Leu
245 250 255

Arg Ile Gly Ile Ile Pro Ala Gly Ser Thr Asp Cys Val Cys Tyr Ser
260 265 270

Thr Val Gly Thr Ser Asp Ala Glu Thr Ser Ala Leu His Ile Val Val
275 280 285

Gly Asp Ser Ser Leu Ala Met Asp Val Ser Ser Val His His Asn Ser Thr
290 295 300

Leu Leu Arg Tyr Ser Val Ser Leu Leu Gly Tyr Gly Phe Tyr Gly Asp
305 310 315 320

Ile Ile Lys Asp Ser Glu Lys Lys Arg Trp Leu Gly Leu Ala Arg Tyr
325 330 335

Asp Phe Ser Gly Leu Lys Thr Phe Leu Ser His His Cys Tyr Glu Gly
340 345 350

Thr Val Ser Phe Leu Pro Ala Gln His Thr Val Gly Ser Pro Arg Asp
355 360 365

Arg Lys Pro Cys Arg Ala Gly Cys Phe Val Cys Arg Gln Ser Lys Gln
370 375 380

Gln Leu Glu Glu Glu Gln Lys Lys Ala Leu Tyr Gly Leu Glu Ala Ala
385 390 395 400

Glu Asp Val Glu Glu Trp Gln Val Val Cys Gly Lys Phe Leu Ala Ile
405 410 415

Asn Ala Thr Asn Met Ser Cys Ala Cys Arg Arg Ser Pro Arg Gly Leu
420 425 430

Ser Pro Ala Ala His Leu Gly Asp Gly Ser Ser Asp Leu Ile Leu Ile
435 440 445

Arg Lys Cys Ser Arg Phe Asn Phe Leu Arg Phe Leu Ile Arg His Thr
450 455 460

Asn Gln Gln Asp Gln Phe Asp Phe Thr Phe Val Glu Val Tyr Arg Val
465 470 475 480

WO 02/28906 PCT/EP01/11516

Lys Lys Phe Gln Phe Thr Ser Lys His Met Glu Asp Glu Asp Ser Asp
 485 490 495

Leu Lys Glu Gly Gly Lys Lys Arg Phe Gly His Ile Cys Ser Ser His
 500 505 510

Pro Ser Cys Cys Cys Thr Val Ser Asn Ser Ser Trp Asn Cys Asp Gly
 515 520 525

Glu Val Leu His Ser Pro Ala Ile Glu Val Arg Val His Cys Gln Leu
 530 535 540

Val Arg Leu Phe Ala Arg Gly Ile Glu Glu Asn Pro Lys Pro Asp Ser
 545 550 555 560

His Ser

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc feature
 <223> 5'-primer: LERI221-L3

<400> 12
 cgctgcatat cgttgttggg gact 24

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc feature
 <223> 3'-primer: LERI221-R2

<400> 13
 ttggagatcc caccgtgtgt tgtg 24

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/028906 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/54, 9/12, 15/62, 5/10, C12Q 1/68, G01N 33/573, 33/53, A61K 38/43, 39/395
- (21) International Application Number: PCT/JP01/11516
- (22) International Filing Date: 5 October 2001 (05.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/238,005 6 October 2000 (06.10.2000) US
60/314,113 23 August 2001 (23.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KOSSIDA, Sophia [GR/FR]; 28 Rue des 36 Ponts, F-31400 Toulouse (FR). ENCINAS, Jeffrey [US/JP]; 3-17-15, Ayameike-kita, Nara-shi, Nara 631-0032 (JP).
- (74) Common Representative: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, 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, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NF, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 14 November 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 02/028906 A3

(54) Title: REGULATION OF HUMAN SPHINGOSINE KINASE-LIKE PROTEIN

(57) Abstract: Reagents which regulate human sphingosine kinase-like protein activity and reagents which bind to human sphingosine kinase-like protein gene products can be used to regulate intracellular signaling intracellular signaling and consequently cell proliferation and apoptosis. Such regulation is particularly useful for treating cancer, allergies including but not limited to asthma, autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, and central and peripheral nervous system disorders, such as Parkinson's disease.

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No. PCT/EP 01/11516
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/54 C12N9/12 C12N15/62 C12N5/10 C1201/68 G01N33/573 G01N33/53 A61K38/43 A61K39/395		
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 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, MPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 52173 A (GUPTA ASHWANI ;MUNROE DONALD (CA); FALZONE GERMAINE R (CA); NPS AL) 8 September 2000 (2000-09-08) figures 7-9; examples 1-13	1-71
X	DATABASE EMBL 'Online! 3 March 2000 (2000-03-03) NIH-MGC: Database accession no. AW503999 XP002208102 abstract	1
X	DATABASE EMBL 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) BATES K: Database accession no. Q9UGE5 XP002208103 abstract	1
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further 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		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicant but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* 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
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* 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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
31 July 2002	16/08/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5616 Patentplan 2 NL - 2500 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Sirin, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/EP 01/11516

C;(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01 60990 A (GENENTECH INC ; RASTELLI LUCA (US); CURAGEN CORP (US)) 23 August 2001 (2001-08-23) the whole document, esp. SEQ ID NOs:5 and 11	1-71
T	WO 01 96575 A (SANKYO CO ; KOHAMA TAKAFUMI (JP); KONO KEITA (JP); SUGIURA MASAKO () 20 December 2001 (2001-12-20) the whole document	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/11516
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 52, 59 and 68 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 13-16, 33, 52, 60, 62, and 68-71 (all in part) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/EP 01 41516

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 13-16, 33, 52, 60, 62, and 68-71 (all in part)

Present claims 13 to 16, 33, 52, 60, 62 and 68 to 71 relate to agents or methods involving said agents defined by reference to a desirable characteristic or property, namely their to bind to the polypeptide of present application or to their ability to modulate the activity of said polypeptide.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents.

In fact, on pages it is specified that the agent to which said claims refer, can be an antibody binding to the polypeptide of present application (pages 31 to 34), ribozymes (pages 36 to 38) and antisense oligonucleotides (pages 34 to 36).

No other agents having the above specified characteristics or properties are defined in present application.

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound/method/apparatus by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed.

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

w/ correction on: patent family members

Inventor: Application No:
PCT/EP 01/11516

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0052173 A	08-09-2000	AU 2899900 A WO 0052173 A2	21-09-2000 08-09-2000
WO 0160990 A	23-08-2001	AU 3828301 A WO 0160990 A2 US 2002082203 A1	27-08-2001 23-08-2001 27-06-2002
WO 0196575 A	20-12-2001	AU 6273401 A WO 0196575 A1	24-12-2001 20-12-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	P 4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 11/14	A 6 1 P 11/14	4 C 0 8 7
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/12	
C 1 2 N 9/12	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	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 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/64	

(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, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ジェフリー・エンシナス

奈良県奈良市あやめ池北3 - 17 - 15

F ターム(参考)	2G045	BB14	BB29	BB46	BB50	BB51	CB01	DA36	FB01	FB02	FB03
		FB05	FB08	FB12	GC10	GC15					
	4B024	AA01	AA11	BA10	CA04	CA07	CA09	CA12	CA20	DA03	EA04
		GA11	HA11	HA13	HA14	HA17					
	4B050	CC01	CC03	CC05	DD11	EE01	LL01	LL03	LL05		
	4B063	QA01	QA05	QA19	QQ02	QQ08	QQ21	QQ27	QQ41	QQ53	QQ61
		QQ89	QQ91	QQ95	QR07	QR08	QR32	QR35	QR40	QR42	QR56
		QR62	QR77	QR80	QS16	QS25	QS33	QS34	QS36	QX01	QX02
	4B065	AA01X	AA58X	AA72X	AA93X	AA93Y	AB01	AC14	BA02	CA29	CA43
		CA44	CA46								
	4C084	AA02	AA06	AA07	AA13	AA17	BA01	BA08	BA22	CA18	CA53
		DC22	DC32	NA14	ZA02	ZA20	ZA59	ZB08	ZB11	ZB13	ZB26
		ZC20									
	4C085	AA13	AA14	BB11	CC02	CC03	CC04	CC05	CC07	CC08	CC21
		CC31	DD23	DD62	DD63	DD86	EE01	FF02	FF03	FF12	FF20

4C086	AA01	AA02	AA03	AA04	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA20
	ZA59	ZB08	ZB11	ZB13	ZB26	ZC20				
4C087	AA01	AA02	BC83	CA12	NA14	ZA02	ZA20	ZA59	ZB08	ZB11
	ZB13	ZB26	ZC20							

专利名称(译)	调节人类鞘氨醇激酶样蛋白		
公开(公告)号	JP2004510429A	公开(公告)日	2004-04-08
申请号	JP2002532488	申请日	2001-10-05
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳股份公司		
[标]发明人	ソフィアコッシダ ジェフリーエンシナス		
发明人	ソフィア・コッシダ ジェフリー・エンシナス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/55 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/14 A61P25/00 A61P25/02 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C12N1 /15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/09 C12N15/54 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33 /15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P11/14 A61P25/00 A61P25/02 C07K2319/00 C12N9/1205		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K31/7105 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.P A61K45/00 A61K48/00 A61P11/14 A61P25/00 A61P25/02 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.111 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33 /53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/64		
F-TERM分类号	2G045/BB14 2G045/BB29 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045 /FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC10 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024 /CA20 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050 /LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ27 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QQ95 4B063/QR07 4B063 /QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063 /QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/BA02 4B065/CA29 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084 /CA53 4C084/DC22 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA20 4C084/ZA59 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB26 4C084/ZC20 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085 /CC02 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085 /FF12 4C085/FF20 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA20 4C086/ZA59 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086 /ZB13 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA20 4C087/ZA59 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB26 4C087 /ZC20		
代理人(译)	田中，三夫		
优先权	60/238005 2000-10-06 US 60/314113 2001-08-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

调节人鞘氨醇激酶样蛋白活性的试剂和结合人鞘氨醇激酶样基因产物的试剂可用于调节细胞内信号传导，从而调节细胞增殖和凋亡。这样的调节对治疗癌症，包括但不限于哮喘的过敏，诸如类风湿性关节炎的自身免疫疾病以及诸如帕金森氏病的中枢和周围神经系统疾病特别有用。

(51) Int. Cl. ⁷	F 1	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 0 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B 0 5 0
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/95	A 6 1 K 38/95	D 4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 181 頁) 最終頁に	
(21) 出願番号	特願2002-532488 (P2002-532488)	(71) 出願人
(66) (22) 出願日	平成13年10月5日 (2001. 10. 5)	バイエル アクチエンゲゼルシャフト
(85) 優先権主張日	平成15年4月7日 (2003. 4. 7)	ドイツ連邦共和国 レーフェルクレーゼン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011516	番地なし)
(87) 国際公開番号	W02002/028906	D-51368 Leverkusen
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002. 4. 11)	Germany
(31) 優先権主張番号	60/238, 005	(74) 代理人
(32) 優先日	平成12年10月6日 (2000. 10. 6)	100081422
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/314, 113	(74) 代理人
(32) 優先日	平成13年8月23日 (2001. 8. 23)	100103230
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 高山 裕貴
		100087114
		(74) 代理人
		弁理士 齋藤 みの里
		(72) 発明者
		ソフィア・コッシダ
		スイス4056バーゼル、ミットレレ・
		ユトラーセ69番
		最終頁に続く

(注) 「発明の名称」は「特許」欄に記載され、本欄には記載されない。