

(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2008-515779

(P2008-515779A)

(43) 公表日 平成20年5月15日(2008.5.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08 ZNA	2G045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C12N 9/16 (2006.01)	C12N 9/16 B	4B050
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C084
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-528921 (P2007-528921)
 (86) (22) 出願日 平成17年8月23日 (2005. 8. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年4月23日 (2007. 4. 23)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2005/002126
 (87) 国際公開番号 W02006/024796
 (87) 国際公開日 平成18年3月9日 (2006. 3. 9)
 (31) 優先権主張番号 0409080
 (32) 優先日 平成16年8月25日 (2004. 8. 25)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 505409247
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ
 ルシェ シアンティフィク
 CENTRE NATIONAL DE
 LA RECHERCHE SCIENT
 IFIQUE
 フランス国, エフ-75794 パリ セ
 デックス 16, リュ ミシェル-アンジ
 ュ, 3
 (74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一
 (74) 代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規リン酸化CDC25Bホスファターゼ配列、その配列に対する抗体並びにその利用

(57) 【要約】

本発明は少なくとも10アミノ酸残基断片を含む、あるいはそれにより構成される、次の配列番号1: DRKMEVEELS_pPLALGRFSL、のペプチドに関するもので、10番目の位置のセリン残基はリン酸化されているのを特徴とし、前記断片は前記リン酸化セリン残基含有断片である。また、本発明は前記定義されたペプチド配列を同定できるポリクローナル又はモノクローナル抗体に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の配列番号 1 の配列；

DRKMEVEELS_pPLALGRFSL (配列番号 1)

に由来するアミノ酸少なくとも約 10 個の断片を含むか、又はその断片により構成され、10 位のセリン残基はリン酸化されており、前記断片は前記リン酸化セリン残基を含むことを特徴とするペプチド配列。

【請求項 2】

以下の配列番号 2 の配列；

MEVEELS_pPLALGR (配列番号 2)

の配列を含むか、又はそれにより構成され、前記の 7 位のセリン残基はリン酸化されていることを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド配列。

【請求項 3】

以下のいずれかの 1 つの配列；

- ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 1 であって、前記 235 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 3 の配列、
 - ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 208 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 4 の配列、
 - ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 249 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 5 の配列、
 - ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 259 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 6 の配列、
 - ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 284 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 7 の配列、
 を含むか、又はそれにより構成されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のペプチド配列。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド配列を認識することのできるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体（但し、前記抗体は、249 位のセリン残基がリン酸化されていない配列番号 8 の配列は認識しない）。

【請求項 5】

請求項 2 で定義した配列番号 2 の配列を認識することのできるポリクローナル抗体（但し、前記抗体は 249 位のセリン残基がリン酸化されていない配列番号 8 の配列は認識しない）。

【請求項 6】

以下の工程；

- ハイブリドーマを得るために、請求項 2 に記載のペプチド配列の注射による免疫動物、特にヒトでないあらかじめ免疫した動物のミエローマと、動物、特にヒトでない動物、の脾臓細胞とを融合する工程、
 - この様にして得られたハイブリドーマを培養する工程、
 - 前記工程において得られ、そして請求項 2 に記載のペプチド配列に対する抗体を分泌するハイブリドーマから選択されたハイブリドーマのクローニングによる回収及び精製の工程、
 を含むことを特徴とする、特に請求項 2 で定義された配列番号 2 のペプチド配列に対する、請求項 4 のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 7】

抗体の全体又は一部をコードする cDNA の発現バンクから選択する工程であって、前記抗体が、ELISA 法においてか、タンパク質転移によりか、又は任意の他の適当な方法により、免疫に用いられた請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のリン酸化ペプチドを認識するが、非リン酸化ペプチドは認識しない能力に基づき選択される抗体である工程を含

10

20

30

40

50

むことを特徴とする、請求項 4 に記載のモノクローナル抗体、特に請求項 2 で定義した配列番号 2 のペプチド配列に対するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド配列、又は請求項 4 若しくは 5 に記載の抗体を、薬剤学的に許容可能な媒体と組み合わせて、活性成分として含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 9】

過剰増殖性疾患、例えば癌の治療目的の薬剤を製造するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド配列、又は請求項 4 若しくは 5 に記載の抗体の使用。

【請求項 10】

培養細胞からの、又は健常若しくは癌組織の切片からの、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド配列を発現する有糸分裂細胞の *in vitro* 検出用方法を実施するための、請求項 4 又は 5 に記載の抗体の利用。

10

【請求項 11】

培養細胞におけるか、又は健常若しくは癌組織の切片、特に乳癌、肺癌あるいは膵臓癌組織の切片における、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のタンパク質配列の過剰発現の *in vitro* 検出用方法を実施するための、請求項 4 又は 5 に記載の抗体の使用。

【請求項 12】

有糸分裂阻害化合物（すなわち、有糸分裂の開始又はその進行を阻害する化合物）の *in vitro* スクリーニング方法であって、前記阻害化合物は、特に抗癌療法のフレームワークで使用されることができ、

20

- 前記化合物と細胞を一緒にすること、及び

- 適当な方法、特に ELISA、タンパク質転移（ウェスタン・ブロット）、又は間接免疫蛍光技術を用いることによって請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド配列を認識することのできる抗体である、請求項 4 又は 5 に記載の抗体との結合の欠如を検出することによる阻害化合物の選択、を含むことを特徴とする前記方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明の課題は、新規リン酸化 CDC 25 CB ホスファターゼ配列及びこれら配列に対するポリクローナル又はモノクローナル抗体である。また、本発明の課題は、特に、細胞有糸分裂阻害化合物（すなわち、有糸分裂の開始又はその進行を阻害する化合物）をスクリーニングする試験管内での (*in vitro*) 方法の実施のためのこれら新規リン酸化配列の使用である。

30

【0002】

細胞分裂の制御機構には多数の因子が関与し、その活性はキナーゼ及びホスファターゼが関与するリン酸化及び脱リン酸化反応によって制御される。多くの癌において、これらの制御機構の解除が確認されている。それらの同定及び性質が、今や癌の診断及び治療に対する新しい展望を開きつつある。

40

【0003】

CDC 25 B は細胞周期を制御するホスファターゼであり、有糸分裂の開始・継続の制御に必須である。これは、哺乳動物において、異なる遺伝子 (CDC 25 A、B、及び C) によりコードされる 3 つのメンバーで構成されるファミリーに属する。CDC 25 B タンパク質は、細胞周期の G 2 期の終わりに発現し、活性化される (Baldin et al., 1997; Gabrielli et al., 1996)。その細胞内での局在は、NES 及び NLS 配列 (Davezac et al., 2000)、並びに、14-3-3 タンパク質との相互作用 (Mils et al., 2000; Forrest et al., 2001) により制御されている。CDC 25 B は、有糸分裂初期反応の “スターター” として作用できることが示唆されている (Nilss

50

on et al., 2000)。これは、中心体が核転座を起こす前の段階における CDC 2 / サイクリン B 複合体の初期の活性化で役割を果たしている可能性がある (Kumagai et al., 1992; Hoffmann et al., 1993)。細胞分裂の進行に必要な構造上並びに生化学的な変化を起こさせるために、CDC 25 B が CDK / サイクリン複合体を活性化する。その活性は、その発現の変化、制御にかかわる相手との結合、及びリン酸化反応により制御される。従って、シグナル・カスケードにより有糸分裂開始に関与する CDC 25 B の触媒活性が変化する。

【0004】

本発明の目的の一つは、新規のリン酸化 CDC 25 B ホスファターゼ配列と、前記リン酸化 CDC 25 B ホスファターゼのリン酸化エピトープに対する新規の抗体とを提供することである。

10

【0005】

本発明の目的の一つは、有糸細胞分裂（特に、有糸分裂開始）を阻害する化合物をスクリーニングする *in vitro* 方法を提供することであり、前記阻害化合物は、特に、抗癌療法の枠組み (framework) での目的で使用されることができる。

【0006】

本発明は、以下の配列番号 1 の配列；

DRKMEVEELS_pPLALGRFSL (配列番号 1)

に由来するアミノ酸少なくとも約 10 個の断片を含むか、又はその断片により構成され、10 位のセリン残基はリン酸化されており、前記断片は前記リン酸化セリン残基を含むことを特徴とするペプチド配列に関する。

20

【0007】

用語「リン酸化残基」は、リン酸基を担持するアミノ酸を意味する。

【0008】

有利な実施態様によると、本発明は、以下の配列番号 2 の配列；

MEVEELS_pPLALGR (配列番号 2)

の配列を含むか、又はそれにより構成され、前記の 7 位のセリン残基はリン酸化されていることを特徴とする、前記定義されたペプチド配列に関する。

【0009】

配列番号 2 の配列は前記配列番号 1 の配列の一断片に相当する。より正確には、それは配列番号 1 の 4 位のアミノ酸から 16 位のアミノ酸までに限定された断片である。

30

【0010】

本発明は、以下のいずれかの 1 つの配列；

- ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 1 であって、前記 235 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 3 の配列、

- ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 208 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 4 の配列、

- ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 249 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 5 の配列、

- ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 259 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 6 の配列、

- ヒト由来 CDC 25 B ホスファターゼタンパク質のスプライシング変異体 CDC 25 B 2 であって、前記 284 位のセリン残基がリン酸化されている配列番号 7 の配列、

40

を含むか、又はそれにより構成されることを特徴とする、前記定義されたペプチド配列に関する。

【0011】

本発明は、また、前記定義されたペプチド配列を認識することのできるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体（但し、前記抗体は、249 位のセリン残基がリン酸化されていない配列番号 8 の配列は認識しない）にも関する。

【0012】

50

配列番号 8 の配列は、非リン酸化 CDC 25 B タンパク質配列に相当する。

【0013】

本発明の有利なポリクローナル抗体は、前記定義された配列番号 2 の配列を認識することを特徴とする。但し、前記抗体は 249 位のセリン残基がリン酸化されていない配列番号 8 の配列は認識しない。

【0014】

配列番号 2 のリン酸化エピトープに対する前記抗体は、ウサギを前記エピトープで免疫することより製造される。

【0015】

より正確には、前記エピトープは、担体 (carrier) タンパク質 (例えば、ヘモシアニン、BSA 又は卵白アルブミン) へ共有結合で結合している。ウサギを、次に、3ヶ月間にわたり免疫し (合計 4 回の注射)、最終回の瀉血で約 50 ml の血清を回収する。次に、血清はリン酸化ペプチドアフィニティークラム、次いで、非-リン酸化ペプチドのアフィニティークラムを用いて二重に精製される。

【0016】

本発明は前記定義されたモノクローナル抗体、特に、前記定義された配列番号 2 のペプチド配列に対するモノクローナル抗体の調製する方法に関し、前記抗体は上に定義されたペプチド配列に対する抗体を分泌するハイブリドーマの選択により生じるものであるか、あるいは、抗体の全体又は部分をコードする相補的 DNA の発現バンク (expression bank) から選択されることで生じることを特徴とする。

【0017】

本発明は、以下の工程；

- ハイブリドーマを得るために、前記定義されたペプチド配列の注射による免疫動物、特にヒトでないあらかじめ免疫した動物のミエローマと、動物、特にヒトでない動物、の脾臓細胞とを融合する工程、

- この様にして得られたハイブリドーマを培養する工程、

- 前記工程において得られ、そして前記定義されたペプチド配列に対する抗体を分泌するハイブリドーマから選択されたハイブリドーマのクローニングによる回収及び精製の工程、

を含むことを特徴とする、特に前記定義された配列番号 2 のペプチド配列に対する、前記定義されたモノクローナル抗体の製造方法に関する。

【0018】

免疫段階に使用される動物は、特に、マウスである。

【0019】

融合用に使用されるミエローマは、特に、マウス由来のものである。

【0020】

融合用に使用される脾臓細胞は、ミエローマが由来したのと同じ動物種由来のもの、すなわち、特にマウス由来のものである。

【0021】

ハイブリドーマは、配列番号 2 のペプチド配列に対する抗体を分泌するものであって、ELISA 法で免疫に用いたリン酸化ペプチドを認識できるが非リン酸化ペプチドを認識できない抗体を産生していることに基づき選択される。

【0022】

本発明は前記定義されたモノクローナル抗体、特に、前記定義した配列番号 2 のペプチド配列に対するモノクローナル抗体の製造方法であって、抗体の全体又は一部をコードする cDNA の発現バンクから選択する工程を含むことを特徴とする製造方法に関する。

【0023】

前記抗体は、配列番号 2 のペプチド配列に対し、ELISA 法において、タンパク質転移 (ウエスタンブロット) により、又は任意の他の適当な方法により、免疫に用いられたリン酸化ペプチドを認識するが、非リン酸化ペプチドは認識しない能力に基づき選択され

10

20

30

40

50

る。

【0024】

本発明は、また、前記定義されたペプチド配列、又は前記定義された抗体を、薬剤学的に許容可能な媒体と組み合わせて、活性成分として含むことを特徴とする医薬組成物に関する。

【0025】

本発明は、また、過剰増殖性疾患、例えば癌の治療目的の薬剤を製造するための、前記定義されたペプチド配列、又は前記定義された抗体の使用に関する。

【0026】

本発明は、また、培養細胞からの、又は健常若しくは癌組織の切片からの、前記定義されたペプチド配列を発現する有糸分裂細胞の *in vitro* 検出用方法を実施するための、前記定義された抗体の使用に関する。

10

【0027】

培養細胞を、抗体の存在下で、固定し、細胞膜を透過性にし、そして、インキュベーションする。抗体の可視化は、蛍光色素を担持する二次抗体（次に、蛍光顕微鏡を用いて観察を行う）か、あるいは、可視光線下で、基質の加水分解及び発色反応の生産を観察可能にすることができる分子かを用いて実施する。組織切片についても同様の実験方策を用いることができる。

【0028】

また、本発明は、培養細胞におけるか、又は健常若しくは癌組織の切片、特に乳癌、肺癌あるいは膵臓癌組織の切片における、前記定義されたタンパク質配列の過剰発現の *in vitro* 検出用方法を実施するための、前期適宜された抗体の使用に関する。

20

【0029】

CDC25Bの過剰発現の実証は、有糸分裂細胞の検出方法と同じ前記の実験方策に基づく。タンパク質転移（ウェスタン・プロット）か、又は健常細胞若しくは癌細胞から調製される全タンパク質抽出物について目的のタンパク質を定量できる任意のその他方法かによって行うことができる。

【0030】

また、本発明は、有糸分裂阻害化合物（すなわち、有糸分裂の開始又はその進行を阻害する化合物）の *in vitro* スクリーニング方法であって、前記阻害化合物は、特に抗癌療法フレームワークで使用されることができ、

30

- 前記化合物と細胞を一緒にすること、及び

- 適当な方法、特にELISA、タンパク質転移（ウェスタン・プロット）、又は間接免疫蛍光技術を用いることによって請求項1～3のいずれか一項に記載のペプチド配列を認識することのできる抗体である、前記定義された抗体との結合の欠如を検出することによる阻害化合物の選択、

を含むことを特徴とする前記スクリーニング方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1A、1B、1C、1D及び1Eは、蛍光抗体法による、異なる細胞周期段階での249位セリンリン酸化型CDC25Bの検出像を示す。図1Aは間期に相当し；図1Bは前期に相当し；1Cは中期に相当し；図1Dは後期/終期に相当し；そして、図1EはG1期に相当する。

40

【図2】タンパク質転移（ウェスタン・プロット）による、249位セリンリン酸化型CDC25Bの検出を示す図である。カラム1は、精製CDC25Bタンパク質のみに相当し；カラム2は、リン酸化ペプチドを用いて精製したCDC25Bタンパク質に相当し；カラム3は、非-リン酸化ペプチドを用いて精製したCDC25Bタンパク質に相当し；そして、カラム4は、ラムダホスファターゼ処理CDC25Bに相当する。

【方法と結果】

【0032】

50

《CDC 25 B ホスファターゼは249位セリンがリン酸化されている》

CDC 25 Bの質量分析による解析で、249位セリン残基のリン酸化を検出することができた。

その後CDC 25 Bタンパク質はトリプシンにより分解された。MS/MS質量分析による解析の結果は、1残基リン酸化ペプチドの存在を示した。このペプチドの断片化により、リン酸基が249位のセリンに存在することを同定した。

【0033】

《249位アミノ酸セリンがリン酸化されたCDC 25 Bタンパク質に対する抗体の製造》

リン酸化セリンが(p)で示されている、MEVEELS(p)PLALGRの配列を持つペプチド(配列番号2)をウサギの免疫に使用した。動物を安楽死させた後、血清を二段階のクロマトグラフィーで精製した：第一段階は特異的抗体を保持するためにリン酸化ペプチドカラムを用い、次に第二段階として、同一配列よりなる非リン酸化MEVEELSPLALGR配列(配列番号9)を持つペプチドカラムを用い、リン酸化された特異的抗体を流出画分として精製した。抗体によるリン酸化ペプチドの認識を、ELISA法により評価した。以後、これらの抗体を抗-S249Pと称する。

10

【0034】

《抗-S249P抗体は有糸分裂細胞のCDC 25 Bタンパク質を認識する》

A) HeLa細胞を固定し使用して、これら抗体を用いた免疫蛍光法による分析を実施した。核の位置を確認するために、細胞を、4'-6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI)で染色した。図1に示す像は、多数の細胞で実施した観察の中の代表例である。これらは、249位のセリンがリン酸化されたCDC 25 Bタンパク質(配列番号2)が有糸分裂中の細胞、特に紡錘体極のレベルで、非常に大量に蓄積していることを示している。免疫に用いたリン酸化ペプチドによる競合テストではこの像は消失するが、非リン酸化ペプチド(MEVEELSPLALGR)、又は、関連性の無いリン酸化ペプチドでは像の消失は認められない。

20

B) CDC 25 Bタンパク質を、培養細胞より精製した後で、249位セリンリン酸化CDC 25 Bタンパク質に対する抗体を用いたタンパク質転移(ウェスタン・プロット)により解析した。図2に示すように、CDC 25 Bタンパク質は*in vivo*で同位にリン酸化されている。ラムダホスファターゼ処理によりこのリン酸化は消失する。免疫に使用したリン酸化ペプチドと競合させると検出できなくなる。

30

これらの観察は、有糸分裂細胞におけるリン酸化CDC 25 Bの検出にはこれら抗体が有効であることを示す。

【応用分野】

【0035】

《A - 有糸分裂細胞の指標》

リン酸化型CDC 25 Bのリン酸化の検出により、培養細胞又は癌組織切片での分裂細胞の存在の検出が可能になる。

249位セリンのリン酸化型CDC 25 Bは有糸分裂細胞に存在する。それは、前期では核に局在し、次に、後期における赤道への侵入に先立って、中期の2つの有糸分裂半紡錘体に濃縮し、そして、有糸分裂の終了とともに消失する。

40

前記リン酸化型CDC 25 Bに対するポリクローナル又はモノクローナル抗体により、CDC 25 Bホスファターゼを発現している任意の有糸分裂細胞の検出も可能になる。

前記有糸分裂細胞の検出は、間接的免疫蛍光又は免疫化学的技術を用い、固定した培養細胞あるいは健常又は癌の組織切片について実施することができる。

従って、前記方法による有糸分裂細胞の検出は、細胞生物学者や解剖病理学者が自由に使いこなすことのできる新規な道具である。

【0036】

《B - 治療方針決定の補助：》

癌におけるCDC 25 Bの発現レベルを考慮に入れることは、治療決定の際の選択(C

50

DC25Bタンパク質を標的とする薬剤使用の可否)で大きな利益をもたらす。249位セリンのリン酸化型CDC25Bの検出は、この応用にあたり大きな利益をもたらす。

CDC25Bの発現は組織により異なる。癌(乳癌、肺癌、膵臓癌など)ではこのタンパク質が過剰に発現していることが示されている。膵臓癌の場合には、癌の成長はCDC25Bの発現と機能に依存している(Guo et al., 2004)。

CDC25Bを標的とすることのできる新しい薬剤が最近業界により開発されている(Prevost et al., 2003)。従って、前記治療を利用するかどうかを決定するために、CDC25Bホスファターゼの発現レベルを考慮することが必須となっている。

249位セリンのリン酸化型CDC25Bに対する抗体を利用することにより、有糸分裂での(そしておそらく活性化された)前記ホスファターゼの形態を可視化することができる。生検や外科措置の後に採取された組織断片でのこのタンパク質の検出(免疫細胞化学による)を実施することは、CDC25Bが過剰発現している場合に、CDC25ホスファターゼ阻害剤の使用を推奨するといった、場合により提供される治療の選択における基本的な情報を提供する。

【0037】

《C-ハイスループット・スクリーニングのセットアップ》

細胞周期阻害分子の研究のために、有糸分裂開始阻害を評価する目的で本発明による抗体を利用することができる。

現在、細胞周期の進行を阻害する分子に関する活発な研究が、多くの薬学関連のグループで行われている。

有糸分裂細胞の指標を明らかにすることは、有糸分裂の開始及びその進行の阻害能力をもつ分子の、簡単なそしてハイスループット・スクリーニングによる選択手段を提供することを意味する。

リン酸化型CDC25Bに対する抗体はこの需要に対応する。従って、これらの抗体は、免疫細胞化学、フロー・サイトメトリー、又は、リン酸化CDC25Bタンパク質の検出を可能にする任意の他の適切な方法にも使用可能である。

《参考文献》

- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G. & Ducommun, B. (1997) Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene*, 14, 2485-2495,
- Davezac, N. et al. (2000) Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization, *Oncogene*, 19, 2179-85,
- Forrest A. & Gabrielli, B. (2001) Cdc25B activity is regulated by 14-3-3, *Oncogene*, 20, 4393-401,
- Gabrielli, B. G. et al. (1996) Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells, *J. Cell. Science*, 109, 1081-1093,
- Guo et al. (2004) Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma, *Oncogene*, 23, 71-81,
- Hoffmann, I., Clarke, P., Marcote, M. J., Karsenti, E. & Draetta, G. (1993) Ph

10

20

30

40

50

osphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self amplification of MPF at mitosis, EMBO J, 12, 53-63,

- Kumagai, A. & Dunphy, W. (1992) Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts, Cell, 70, 139-151,

- Mils, V. et al. (2000) Specific interaction between 14.3.3 isoforms and the human CDC25B phosphatase, Oncogene, 19, 1257-1265,

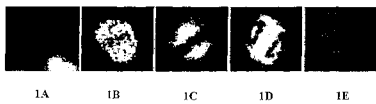
- Nilsson, I. & Hoffmann, I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family, Prog Cell Cycle Res, 4, 107-114,

- Prevost, G. et al. (2003) Inhibitors of the CDC25 phosphatases in "Progress in cell cycle research" Ed. Meijer, L., Jezequel, A., Roberge, M., vol. 5, 225-234

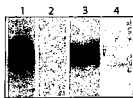
10

20

【 図 1 】



【 図 2 】



【配列表】

2008515779000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/002126

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/47		
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) C07K 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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GABRIELLI BRIAN G ET AL: "Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 45, 7 November 1997 (1997-11-07), pages 28607-28614, XP002173983 ISSN: 0021-9258 page 28607, right-hand column, last paragraph - page 28610, right-hand column, paragraph 1; figures 1,3A ----- -/-	1-3
<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 application 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		*B* 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 16 January 2006		Date of mailing of the international search report 02/02/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Steffen, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR2005/002126

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BALDIN V ET AL: "Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 26 DEC 1997, vol. 272, no. 52, 26 December 1997 (1997-12-26), pages 32731-32734, XP002309641 ISSN: 0021-9258 page 32731, right-hand column, paragraph 3 - page 32732, left-hand column, paragraph 1; figure 1a	1-3
X	LAMMER C ET AL: "The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells." JOURNAL OF CELL SCIENCE, AUG 1998, vol. 111 (Pt 16), August 1998 (1998-08), pages 2445-2453, XP002309642 ISSN: 0021-9533 page 2448, right-hand column, last paragraph - page 2449, right-hand column, last paragraph; figures 4,5	1-3
A	BALDIN V ET AL: "PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation" BIOLOGY OF THE CELL, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 95, no. 8, November 2003 (2003-11), pages 547-554, XP002277362 ISSN: 0248-4900 the whole document	1-12
A	DUTERTRE S ET AL: "PHOSPHORYLATION OF CDC25B BY AURORA-A AT THE CENTROSOME CONTRIBUTES TO THE G2-M TRANSITION" JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 117, no. 12, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 2523-2531, XP009036107 ISSN: 0021-9533 the whole document	1-12
A	WO 02/38143 A (FORNACE ALBERT J JR ; US GOVERNMENT (US); BULAVIN DMITRY V (US)) 16 May 2002 (2002-05-16) example 19	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2005/002126

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0238143	A	AU 3957802 A	21-05-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/002126

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE C07K14/47	
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB	
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE	
Documentation minimaux consultés (système de classification suivi des symboles de classement) C07K C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche	
Bases de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, Sequence Search, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS	
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS	
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents
	no. des revendications visées
X	GABRIELLI BRIAN G ET AL: "Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 45, 7 novembre 1997 (1997-11-07), pages 28607-28614, XP002173983 ISSN: 0021-9258 page 28607, colonne de droite, dernier alinéa - page 28610, colonne de droite, alinéa 1; figures 1,3A ----- -/--
	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:	
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
16 janvier 2006	02/02/2006
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 81 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Steffen, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2005/002126

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BALDIN V ET AL: "Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 26 DEC 1997, vol. 272, no. 52, 26 décembre 1997 (1997-12-26), pages 32731-32734, XP002309641 ISSN: 0021-9258 page 32731, colonne de droite, alinéa 3 - page 32732, colonne de gauche, alinéa 1; figure 1a	1-3
X	LAMMER C ET AL: "The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells." JOURNAL OF CELL SCIENCE. AUG 1998, vol. 111 (Pt 16), août 1998 (1998-08), pages 2445-2453, XP002309642 ISSN: 0021-9533 page 2448, colonne de droite, dernier alinéa - page 2449, colonne de droite, dernier alinéa; figures 4,5	1-3
A	BALDIN V ET AL: "PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation" BIOLOGY OF THE CELL, ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 95, no. 8, novembre 2003 (2003-11), pages 547-554, XP002277362 ISSN: 0248-4900 le document en entier	1-12
A	DUTERTRE S ET AL: "PHOSPHORYLATION OF CDC25B BY AURORA-A AT THE CENTROSOME CONTRIBUTES TO THE G2-M TRANSITION" JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 117, no. 12, 15 mai 2004 (2004-05-15), pages 2523-2531, XP009036107 ISSN: 0021-9533 le document en entier	1-12
A	WO 02/38143 A (FORNACE ALBERT J JR ; US GOVERNMENT (US); BULAVIN DMITRY V (US)) 16 mai 2002 (2002-05-16) exemple 19	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR2005/002126

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0238143	A	16-05-2002 AU 3957802 A	21-05-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
	G 0 1 N 33/50 Z	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 デュコミュン ベルナール
フランス国, エフ - 3 1 4 5 0 ベルベロー, シェマン デュ パラディス, 1

(72) 発明者 カザレ マルティン
フランス国, エフ - 3 1 2 3 0 バルマ, リュ デュ ガイ サヴォワール, 3 5

(72) 発明者 モンサラット ベルナール
フランス国, エフ - 8 1 0 0 0 アルピ, リュ デュ コロネル マーネ, 1 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA36 FB03 FB05 FB12
4B024 AA01 AA11 BA11 BA41 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20
GA05 GA11 HA01 HA11
4B050 CC04 DD07 LL01 LL03
4B064 AG01 AG26 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA05 DA13
DA14
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA23 BA33 CA18 DC50 NA14
ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 BB01 CC32
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA16 BA17 CA40 DA75 DA76 EA20
EA50 FA74

专利名称(译)	新的磷酸化CDC25B磷酸酶序列，针对其序列的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2008515779A	公开(公告)日	2008-05-15
申请号	JP2007528921	申请日	2005-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	全国中心德拉Rusherushe Shiantifiku		
[标]发明人	デュコミュンベルナール カザレマルティン モンサラットベルナール		
发明人	デュコミュンベルナール カザレマルティン モンサラットベルナール		
IPC分类号	C07K7/08 C12N15/09 C12N9/16 C07K16/40 C12P21/08 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	C12N9/16		
FI分类号	C07K7/08.ZNA C12N15/00.A C12N9/16.B C07K16/40 C12P21/08 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B050/CC04 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA33 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC32 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	2004009080 2004-08-25 FR		
其他公开文献	JP2008515779A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

肽序列包括衍生自以下SEQ ID NO : 1的至少10个氨基酸的片段 : DRKMEVEELS p PLALGRFSL SEQ ID NO : 1其中10位的丝氨酸残基被磷酸化，上述 - 提到含有磷酸化丝氨酸残基的片段。还公开了能够鉴定如上定义的肽序列的多克隆或单克隆抗体。

