

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 539792

(P2002 - 539792A)

(43)公表日 平成14年11月26日(2002.11.26)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	P 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/395		45/00	4 B 0 2 4
45/00		A 6 1 P 3/00	4 B 0 5 0
A 6 1 P 3/00		35/00	4 B 0 6 3
35/00		37/00	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 56数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 606758(P2000 - 606758)

(86)(22)出願日 平成12年3月22日(2000.3.22)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月25日(2001.9.25)

(86)国際出願番号 PCT/US00/07589

(87)国際公開番号 W000/56899

(87)国際公開日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(31)優先権主張番号 60/125,957

(32)優先日 平成11年3月24日(1999.3.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/527,376

(32)優先日 平成12年3月16日(2000.3.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 セブティル, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ワシントン 98021, ボ
セル, 26ティーエイチ アベニュー サウ
スイースト - 22215

(72)発明者 ルーケ, ラルフ エム.
アメリカ合衆国 ワシントン 98155, シ
アトル, ノーススイースト 196ティーエイ
チ コート 4028

(72)発明者 ウェイ, ボ
アメリカ合衆国 ワシントン 98296, ス
ノーミッシュ, 64ティーエイチ アベニュー
サウスイースト 12828

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D S P - 2 二重特異性 M A P キナーゼホスファターゼ

(57)【要約】

本発明の組成物および方法は、細胞増殖、細胞分化、および細胞の生存に関する状態の処置のために提供される。詳細には、二重特異性ホスファターゼ D S P - 2、および D S P - 2 基質の脱リン酸化を刺激する D S P - 2 のポリペプチド改変体を提供する。D S P - 2 のポリペプチドを用いて、例えば、D S P - 2 活性を阻害する抗体および他の薬剤を同定し得る。D S P - 2 のポリペプチドおよび薬剤を用いて、細胞増殖、細胞分化、および細胞の生存を調節し得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリペプチドが、活性化MAP-キナーゼを脱リン酸化する能力を保持するような、配列番号2に列挙されるDSP-2の配列を有する単離されたポリペプチド、あるいは配列番号2の中の残基の50%を超えない1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換により異なるポリペプチドの改変体。

【請求項2】 配列番号2に対応する配列を有するポリペプチドの少なくとも10個の連続するアミノ酸をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】 配列番号2に対応する配列を有するポリペプチドの少なくとも15個の連続するアミノ酸をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項2または3に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の発現ベクターを用いて、形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項6】 請求項1に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】 配列番号1に列挙された配列を含む、請求項6に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】 請求項6に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項9】 請求項8に記載の発現ベクターを用いて、形質転換またはトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項10】 請求項6に記載のポリヌクレオチドに相補的な、少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含む、アンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項11】 配列番号1に列挙される配列の相補鎖に、50℃にて、少なくとも15分間、 $0.1 \times SSC$ および0.1% SDS中に洗浄剤を含む条件下で、検出可能にハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項10または11に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項13】 請求項12に記載の発現ベクターを用いて、形質転換また

はトランスフェクトした宿主細胞。

【請求項14】 以下の工程：

(a) 請求項9に記載の宿主細胞を、DSP-2ポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養する工程；および

(b) 該宿主細胞培養物から、DSP-2ポリペプチドを単離する工程、を包含する、DSP-2ポリペプチドを産生する方法。

【請求項15】 配列番号2に記載の配列を有するDSP-2ポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項16】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項15に記載の抗体または抗体のフラグメント。

【請求項17】 生理学的に受容可能なキャリアと組み合わせた、請求項15に記載の抗体または抗体のフラグメントを含む、薬学的組成物。

【請求項18】 以下：

(a) サンプルを、請求項15に記載の抗体または抗原結合フラグメントと、抗体/DSP-2複合体を形成させるのに十分な条件かつ時間で接触させる工程；および

(b) 該抗体/DSP-2複合体のレベルを検出し、そしてそこからサンプル中のDSP-2の存在を検出する工程、を包含する、サンプル中のDSP-2発現を検出するための方法。

【請求項19】 前記抗体が支持物質に連結される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記抗体が検出可能なマーカーに連結される、請求項18に記載の方法。

【請求項21】 前記サンプルが患者から得られる生物学的サンプルである、請求項18に記載の方法。

【請求項22】 以下：

(a) サンプルを、請求項10または11に記載のアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程；および

(b) 該アンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズするDSP-2ポリヌ

クレオチドの量を検出し、そしてそこからサンプル中のD S P - 2 発現を検出する工程、

を包含する、サンプル中のD S P - 2 発現を検出するための方法。

【請求項23】 前記アンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズするD S P - 2 ポリヌクレオチドの量が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて決定される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記アンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズするD S P - 2 ポリヌクレオチドの量が、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて決定される、請求項22に記載の方法。

【請求項25】 前記サンプルがRNAまたはcDNA調製物である、請求項22に記載の方法。

【請求項26】 以下の工程：

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを有する候補薬剤を、ポリペプチドと候補薬剤との間の相互作用を可能にするのに十分な条件かつ時間で接触させる工程；および

(b) 引き続き、該ポリペプチドのD S P - 2 基質を脱リン化する能力を、該候補薬剤の非存在下でD S P - 2 基質を脱リン酸化する、該ポリペプチドの予め決められた能力に対して評価する工程；およびそれからD S P 2 活性を調節する薬剤を同定する工程、

を包含する、D S P - 2 活性を調節する薬剤をスクリーニングするための方法。

【請求項27】 前記D S P - 2 基質がMAPキナーゼである、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記候補薬剤が低分子である、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記低分子がコンビナトリアルライブラリー内に存在する、請求項26に記載の方法。

【請求項30】 以下の工程：

(a) 候補薬剤を、検出可能な転写物またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したD S P - 2 プロモーターを含む細胞と、該プロモーターと該候補薬剤との間の相互作用を可能にするのに十分な条件と時間で接触さ

せる工程；および

(b) 引き続いて、該ポリペプチドの発現を、該候補薬剤の非存在下での発現の予め決められたレベルに対して評価する工程；およびそれからDSP2活性を調節する薬剤を同定する工程、

を包含する、DSP-2活性を調節する薬剤についてスクリーニングする方法。

【請求項31】 前記ポリヌクレオチドがDSP-2ポリペプチドをコードする、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 前記ポリヌクレオチドがレポータータンパク質をコードする、請求項30に記載の方法。

【請求項33】 細胞を、DSP-2活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する、細胞における増殖応答を調節するための方法。

【請求項34】 細胞を、DSP-2活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する、細胞の分化を調節するための方法。

【請求項35】 細胞を、DSP-2活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する、細胞の生存を調節するための方法。

【請求項36】 前記薬剤が遺伝子発現のパターンを調節する、請求項33～35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】 前記細胞が細胞増殖の接触阻害を示す、請求項33～35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】 前記細胞が足場非依存性増殖を示す、請求項33～35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項39】 前記細胞が変化した細胞間接着特性を示す、請求項33～35のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】 前記薬剤がアポトーシスを調節する、請求項35に記載の方法。

【請求項41】 前記薬剤が細胞周期を調節する、請求項35に記載の方法

。

【請求項42】 前記細胞が患者の中に存在する、請求項32に記載の方法

。

【請求項43】 患者にDSP-2活性を調節する薬剤の治療的に有効量を投与する工程を包含する、DSP-2活性に関する障害に罹患した患者を処置するための方法。

【請求項44】 前記障害が、癌、対宿主性移植片病、自己免疫疾患、アレルギー、代謝障害、異常な細胞増殖、異常な細胞分化、および細胞周期の異常からなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 患者にDSP-2活性を調節する薬剤の治療的に有効な量を投与する工程を包含する、患者における移植された組織の拒絶を阻止するための方法。

【請求項46】 ポリペプチドが、DSP-2に対して実質的に減少しない親和性で基質に結合するように、かつ該ポリペプチドが基質を脱リン酸化する能力がDSP-2に対して低下するように、配列番号2に列挙される配列と配列番号2の中の残基の50%を超えない、1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿入または置換により異なる、DSP-2基質捕捉変異体ポリペプチド。

【請求項47】 前記ポリペプチドが、配列番号2の73位または104位での置換を含む、請求項46に記載の基質捕捉変異体ポリペプチド。

【請求項48】 以下の工程：

(a) 候補分子を請求項1に記載のポリペプチドと、該候補分子とポリペプチドを相互作用させるのに十分な条件かつ時間で接触させる工程；および

(b) 該候補分子の該ポリペプチドへの結合の有無を検出し、そしてそこから該候補分子がDSP-2と相互作用するか否かを決定する工程、を包含する、分子をDSP-2と相互作用する能力についてスクリーニングする方法。

【請求項49】 前記検出する工程が、アフィニティー精製工程を包含する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記検出する工程が、酵母ツーハイブリットスクリーニングまたはファージディスプレイライブラリーのスクリーニングを包含する、請求項48に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、一般的に、細胞増殖、細胞分化、および/または細胞生存における欠損と関連する状態を処置するために有用な組成物および方法に関する。本発明は、より詳細には、二重特異性プロテインホスファターゼおよびそのポリペプチド改変体に関する。本発明はまた、増殖性応答、細胞分化、および/または細胞生存をもたらすシグナル伝達を調節する抗体および他の因子（低分子を含む）の同定のためのそのようなポリペプチドの使用に関する。

【0002】**(発明の背景)**

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPキナーゼ)は、種々の保存性のメンバーを有する保存された細胞シグナル伝達経路の構成要素として存在する。MAPキナーゼは、配列Thr-X-Tyrを有する二重リン酸化モチーフにおけるリン酸化(MAPキナーゼキナーゼによる)によって活性化される。ここで、チロシン残基およびスレオニン残基のリン酸化が活性に必要である。活性化されたMAPキナーゼは、いくつかの伝達標的(transduction target)(転写因子を含む)をリン酸化する。MAPキナーゼの不活性化は、MAPキナーゼホスファターゼと呼ばれる二重特異性ホスファターゼによる、この部位の脱リン酸化によって媒介される。高等真核生物において、MAPキナーゼシグナル伝達の生理的役割は、増殖、発癌、発生、および分化といった細胞内事象と相関していた。従って、これらの経路を介してシグナル伝達を調節する能力は、MAPキナーゼシグナル伝達と関連するヒト疾患(例えば、癌)についての処置および予防療法の開発をもたらす得る。

【0003】

二重特異性プロテインチロシンホスファターゼ(二重特異性ホスファターゼ)は、ホスホチロシン残基とホスホスレオニン/セリン残基との両方を脱リン酸化するホスファターゼである(Waltonら、Ann.Rev.Biochem.62:101-120、1993)。MAPキナーゼを不活性化するいくつか

の二重特異性ホスファターゼが同定されており、これらには、MKP-1 (WO 97/00315; KeyseおよびEmslie, Nature 59:644-647, 1992)、MKP-4、MKP-5、MKP-7、Hb5 (WO 97/06245)、PAC1 (Wardら, Nature 367:651-654, 1994)、HvH2 (GuanおよびButch, J. Biol. Chem. 270:7197-7203, 1995)、およびPYST1 (Groomら, EMBO J. 15:3621-3632, 1996)が含まれる。特定の二重特異性ホスファターゼの発現は、ストレスまたはマイトジェンによって誘導されるが、他の二重特異性ホスファターゼは、特定の細胞型において構成的に発現されるようである。二重特異性ホスファターゼの発現および活性の調節は、細胞増殖、細胞分化、および細胞生存を含む、MAPキナーゼ媒介細胞機能の制御のために重要である。例えば、二重特異的ホスファターゼは、細胞増殖のネガティブレギュレーターとして機能し得る。細胞の型または活性化に関して、種々の特異性を有する多くのこのような二重特異性ホスファターゼが存在する可能性がある。しかし、二重特異性ホスファターゼの調節は、理解が乏しいままであり、そして比較的少ない数の二重特異性ホスファターゼのみが同定されている。

【0004】

従って、当該分野において、MAPキナーゼシグナル伝達カスケードにおけるMAPシグナル伝達および二重特異性ホスファターゼの調節の理解の改善についての必要性が存在する。二重特異性ホスファターゼ調節の理解の増加は、MAPキナーゼカスケードに関与するタンパク質の活性を調節するため、およびこのようなカスケードと関連する状態を処置するための方法の開発を容易にし得る。本発明は、これらの必要性を満足し、そしてさらに、他の関連する利点を提供する。

【0005】

(発明の要旨)

手短に述べれば、本発明は、細胞増殖応答を調節し得る因子を同定するための組成物および方法を提供する。1つの局面において、本発明は、配列番号2に列挙されるDSP-2の配列を有する単離されたDSP-2ポリペプチド、または

配列番号2の残基のせいぜい50%以下での1以上アミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換において異なり、その結果、そのポリペプチドは活性化MAPキナーゼを脱リン酸化する能力を保持している、そのポリペプチドの改変体を提供する。

【0006】

さらなる局面において、本発明は、配列番号2に対応する配列を有するポリペプチドの少なくとも10連続するアミノ酸をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。特定の実施形態において、本発明は、配列番号2に対応する配列を有するポリペプチドの少なくとも15連続するアミノ酸をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。特定のこのようなポリヌクレオチドは、DSP-2ポリペプチドをコードする。なおさらに、ポリヌクレオチドは、DSP-2ポリヌクレオチドの一部に相補的であり、そして/または0.1×SSCおよび0.1% SDS中で、50 で、少なくとも15分間の洗浄を含む条件下で、配列番号1に列挙される配列の相補体に検出可能にハイブリダイズする、少なくとも15連続するヌクレオチドを含むアンチセンスポリヌクレオチドであり得る。前述のポリヌクレオチドのいずれかを含む発現ベクター、およびそのような発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞もまた、提供される。

【0007】

本発明はさらに、他の局面において、以下の工程：(a) DSP-2ポリペプチドの発現を可能にする条件下で、上記のように宿主細胞を培養する工程；および(b)上記宿主細胞培養物からDSP-ポリペプチドを単離する工程、を包含する、DSPポリペプチドを産生するための方法を提供する。

【0008】

単離された抗体、およびDSP-2ポリペプチド(例えば、配列番号2の配列を有するポリペプチド)に特異的に結合する、その抗原結合フラグメントもまた、本発明によって提供される。

【0009】

本発明はさらに、他の局面において、上記のようなポリペプチド、ポリヌクレ

オチド、その抗体またはフラグメントを含む、生理学的に受容可能なキャリアと合わせた薬学的組成物を提供する。

【0010】

さらなる局面において、本発明は、サンプル中のDSP-2発現を検出するための方法を提供し、この方法は、(a)上記のように、抗体/DSP-2複合体の形成を可能にするのに十分な条件下および時間の間、サンプルを抗体またはその抗原結合フラグメントとを接触させる工程；および(b)抗体/DSP-2複合体のレベルを検出する工程、を包含する。

【0011】

なお他の局面において、本発明は、サンプル中のDSP-2発現を検出するための方法を提供し、この方法は、(a)上記のように、サンプルとアンチセンスポリヌクレオチドとを接触させる工程；および(b)アンチセンスポリヌクレオチドとハイブリダイズするDSP-2ポリヌクレオチドの量をサンプル中で検出する工程、を包含する。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応またはハイブリダイゼーションアッセイを用いて、アンチセンスポリヌクレオチドとハイブリダイズするDSP-2ポリヌクレオチドの量が決定され得る。

【0012】

本発明はまた、酵素活性および/または基質結合のモジュレーターについてのスクリーニングアッセイにおいて有用なDSP-2ポリペプチドを提供する。他の局面において、DSP-2活性を調節する因子についてスクリーニングするための方法もまた提供され、この方法は以下の工程を包含する：(a)上記のように、ポリペプチドと候補薬剤との間の相互作用を可能にするのに十分な条件下および時間の間、候補薬剤をDSP-2ポリペプチドと接触させる工程；および(b)続いて、候補薬剤の非存在下で、そのポリペプチドがDSP-2を脱リン酸化するあらかじめ決定した能力と比較して、そのポリペプチドのDSP-2基質を脱リン酸化する能力を評価する工程。このような方法は、インビトロまたは細胞環境中(例えば、インタクトな細胞中)で実行され得る。

【0013】

さらなる局面において、DSP-2活性を調節する薬剤についてスクリーニン

グするための方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：(a) 候補薬剤を、検出可能な転写物またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたDSP-2プロモーターを含む細胞と、そのプロモーターと候補薬剤との間の相互作用を可能にするに十分な条件下かつそれを可能にするに十分な時間の間、接触させる工程；ならびに引き続いて(b) 候補薬剤の不在下での所定のレベルの発現に対して、そのポリヌクレオチドの発現を評価する工程。

【0014】

また、細胞における増殖性応答を調節するための方法も提供され、その方法は、DSP-2活性を調節する薬剤を細胞と接触させる工程を包含する。

【0015】

さらなる局面において、細胞の分化を調節するための方法が提供され、その方法は、DSP-2活性を調節する薬剤と細胞を接触させる工程を包含する。

【0016】

本発明はさらに、細胞の生存を調節するための方法が提供され、その方法は、DSP-2活性を調節する薬剤と細胞を接触させる工程を包含する。

【0017】

関連する局面において、本発明は、DSP-2活性と関連する(かまたは、DSP-2の投与により処置可能な)障害に罹患した患者を処置するための方法を提供し、この方法は、DSP-2活性を調節する薬剤の治療上有効な量を患者に投与する工程を包含する。このような障害としては、癌、対宿主性移植片病、自己免疫疾患、アレルギー、代謝疾患、異常な細胞成長(growth)、異常な細胞増殖(proliferation)および細胞周期異常、ならびに移植組織の拒絶が、挙げられる。

【0018】

さらなる局面において、DSP-2基質捕捉変異体ポリペプチドが提供される。このようなポリペプチドは、配列番号2において残基のうちの50%以下での1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿入または置換にて、配列番号2に記載される配列と異なり、その結果、そのポリペプチドは、DSP-2に対してそれほど

は減少しない親和性にて基質に結合し、そしてそのポリペプチドが基質を脱リン酸化する能力は、DSP-2に対して減少される。特定の実施形態において、基質捕捉変異体ポリペプチドは、配列番号2の73位または104位の置換を含む。

【0019】

本発明はさらに、1つの局面において、DSP-2と相互作用する能力について分子をスクリーニングするための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：(a)上記のポリペプチドと候補分子を、その候補分子とポリペプチドとが相互作用するのを可能にするに十分な条件かつそれを可能にするに十分な時間の間、接触させる工程；ならびに(b)そのポリペプチドへのその候補分子の結合の存在または不在を検出する工程。この検出工程は、例えば、アフィニティ精製工程、酵母ツーハイブリッドスクリーニング、またはファージディスプレイのスクリーニングを含み得る。

【0020】

本発明のこれらの局面および他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによって、明らかになる。本明細書中に開示されるすべての参考文献は、各々が個別に援用されたかのように、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【0021】

(発明の詳細な説明)

上記のように、本発明は、一般的に、インビトロおよびインビボでの細胞増殖性応答を調節(すなわち、刺激または阻害)するための、組成物および方法に関する。詳細には、本発明は、二重特異性ホスファターゼDSP-2(図1~2；配列番号1~2)、ならびにその改変体、ならびにDSP-2に特異的に結合する抗体を提供する。また、本明細書中に提供されるのは、スクリーニング、検出アッセイ、および関連する治療用途のためにこのような化合物を使用するための、方法である。

【0022】

(DSP-2ポリペプチドおよびDSP-2ポリヌクレオチド)

本明細書中で使用される場合、用語「DSP-2ポリペプチド」とは、本明細書中に提供されるようなDSP-2配列またはそのような配列の改変体を含む、ポリペプチドをいう。このようなポリペプチドは、DSP-2基質中のチロシン残基およびスレオニン/セリン残基の両方を脱リン酸化し得、ネイティブの全長DSSP-2の活性に対して、それほど減少しない活性を有する。DSP-2基質は、活性化(すなわち、リン酸化)MAP-キナーゼを含む。他の基質は、本明細書中で記載されるように、基質捕捉変異体を使用して同定され得、そして1つ以上のリン酸化チロシン残基、スレオニン残基および/またはセリン残基を有するポリペプチドを含む。

【0023】

本発明の範囲内のDSP-2ポリペプチド改変体は、1つ以上の置換、欠失、付加および/または挿入を含み得る。特定のDSP-2改変体について、この改変体が、DSP-2基質内のチロシンおよびスレオニン残基を脱リン酸化する能力は、実質的に減少しない。このようなDSP-2改変体が、DSP-2基質内のチロシンおよびスレオニン残基を脱リン酸化する能力は、ネイティブのDSP-2と比較して、増強され得るか、または無変化であり得るか、あるいは、ネイティブのDSP-2と比較して、50%未満、そして好ましくは、20%未満減少され得る。このような改変体は、本明細書中で提供される代表的なアッセイを使用して、同定され得る。

【0024】

本発明によって、特定の機能が無能であるDSP-2の改変された形態がまた意図される。例えば、このようなタンパク質は、構成的に活性または不活性であり得るか、あるいは、変更された結合性質または触媒性質を示し得る。このような変更されたタンパク質は、周知技術を使用して生成され得、そして変更された機能は、本明細書中で提供されるようなスクリーニングを使用して確認され得る。特定の改変されたDSP-2ポリペプチドは、「基質捕捉変異体」として公知である。このようなポリペプチドは、基質を結合する能力(すなわち、 K_m が実質的に減少されない)を保持するが、減少した基質を脱リン酸化する能力(すなわち、 k_{cat} が、好ましくは、1分当たり1未満まで減少される)を示す。さら

に、基質捕捉変異体 / 基質複合体の安定性は、DSP - 2 / 基質複合体の安定性と比較して、実質的に減少されないはずである。複合体安定性は、会合定数 (K_a) に基づいて評価され得る。 K_m 、 k_{cat} および K_a の決定は、当該分野で公知の標準的な技術 (例えば、WO 98/04712; Lehninger, Biochemistry, 1975 Worth Publishers, NY を参照のこと) および本明細書中で提供されるアッセイを使用して、容易に達成され得る。基質捕捉変異体は、例えば、DSP - 2 の 73 位または 104 位でのアミノ酸置換での改変によって (例えば、73 位のアミノ酸アスパラギン酸のアラニン残基での置換、または 104 位のシステインのセリンでの置換によって) 生成され得る。基質捕捉変異体は、例えば、DSP - 2 基質を同定するために使用され得る。手短かに言えば、改変された DSP - 2 は、候補基質と接触し (単独、または細胞抽出物のようなタンパク質の混合物内で)、基質 / DSP - 2 複合体の形成を可能にし得る。次いで、この複合体は、従来技術によって単離され、基質の単離および特徴付けを可能にし得る。基質捕捉変異体の調製および使用は、例えば、PCT 公開番号 WO 98/04712 に記載される。

【0025】

好ましくは、改変体は、保存的置換を含む。「保存的置換」は、アミノ酸が、類似の性質を有する別のアミノ酸で置換され、その結果、ペプチド科学の当業者が、ポリペプチドの二次構造およびヒドロパシーの (hydrophobic) 性質が、実質的に変化しないことを予期する置換である。アミノ酸置換は、一般的に、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および / または両親媒性性質の類似性に基づいてなされ得る。例えば、負に荷電したアミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる ; 正に荷電したアミノ酸としては、リシンおよびアルギニンが挙げられる ; ならびに類似の親水性価を有する非荷電の極性ヘッド基 (head group) を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシンおよびバリン ; グリシンおよびアラニン ; アスパラギンおよびグルタミン ; ならびにセリン、スレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保存的变化を代表し得るアミノ酸の他のグループとしては以下が挙げられる : (1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、

ser、thr；(2)cys、ser、tyr、thr；(3)val、ile、leu、met、ala、phe；(4)lys、arg、his；および(5)phe、tyr、trp、his。改変体はまた、あるいは代わりに、非保存的变化を含み得る。

【0026】

一般的に、改変は、非臨界領域において、より容易になされ得、非臨界領域とは、DSP-2の活性を実質的に変化しないネイティブ配列の領域である。非臨界領域は、本明細書中に記載されるような、特定の領域におけるDSP-2配列の改変、およびホスファターゼアッセイにおける得られた改変体の能力の評価によって同定され得る。好ましい配列改変は、活性部位ドメイン(LHCAA G V S R S、配列番号3)を保持するようになされる。特定の好ましい実施形態内で、このような改変は、DSP-2と、DSP-2基質ではなく細胞成分との間の相互作用に影響を及ぼす。しかし、置換はまた、得られた改変体が、実質的に、基質脱リン酸化を刺激する能力を保持するならば、ネイティブタンパク質の臨界領域においてなされ得る。特定の実施形態内で、改変体は、50%以下、好ましくは、25%以下のアミノ酸残基の、置換、欠失、付加および/または挿入を含む。

【0027】

改変体はまた(あるいは、代わりに)、例えば、ポリペプチドの活性に対して最小の影響を有するアミノ酸の欠失または付加によって改変され得る。特に、改変体は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端で、さらなるアミノ酸配列を含み得る。このような配列は、例えば、ポリペプチドの精製または検出を容易にするために使用され得る。

【0028】

DSP-2ポリペプチドは、種々の周知技術のうちのいずれかを使用して調製され得る。以下に記載されるようなDNA配列によってコードされる組換えポリペプチドは、当業者に公知の種々の発現ベクターのうちのいずれかを使用して、DNA配列から容易に調製され得る。発現は、組換えポリペプチドをコードするDNA分子を含む発現ベクターで形質転換されたか、またはそのベクターでトラ

ンスフェクトされた、任意の適切な宿主細胞において達成され得る。適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母および高等真核生物細胞（哺乳動物細胞を含む）が挙げられ、そしてグリコシル化の異なる形態は、宿主細胞または単離後のプロセッシングを変化させることによって生成され得る。培養培地へ組換えタンパク質またはポリペプチドを分泌する適切な宿主/ベクター系由来の上清は、市販のフィルターを使用して最初に濃縮され得る。濃縮後、濃縮物を、適切な精製マトリックス（例えば、アフィニティマトリックスまたはイオン交換樹脂）に適用し得る。最終的に、1つ以上の逆相HPLC工程を利用して、組換えポリペプチドをさらに精製し得る。

【0029】

約100よりも少ないアミノ酸、そして一般的には約50よりも少ないアミノ酸を有する、部分および他の改変体はまた、当業者に周知の技術を使用して、合成手順によって生成され得る。例えば、このようなポリペプチドは、市販の固相技術（例えば、Merri field固相合成法）のうちのいずれかを使用して、合成され得る。ここで、アミノ酸は、連続して、伸長するアミノ酸鎖に付加される。Merri field, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 - 2146, 1963を参照のこと。ポリペプチドの自動合成のための装置は、Perkin-Elmer, Inc., Applied BioSystems Division (Foster City, CA)のような供給者から市販されており、そして製造業者の使用説明書に従って、操作され得る。

【0030】

「DSP-2ポリヌクレオチド」は、DSP-2ポリペプチドまたはその改変体の少なくとも一部分をコードする任意のポリヌクレオチドであるか、あるいはこのようなポリヌクレオチドに相補的である任意のポリヌクレオチドである。好ましいポリヌクレオチドは、DSP-2ポリペプチドをコードするか、またはこのような配列に相補的である、少なくとも15の連続したヌクレオチド、好ましくは、少なくとも30の連続したヌクレオチドを含む。特定のポリヌクレオチドは、DSP-2ポリペプチドをコードする；他のポリヌクレオチドは、以下に記載されるようなプローブ、プライマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドと

しての使用を見出し得る。ポリヌクレオチドは、一本鎖（コード鎖またはアンチセンス鎖）あるいは二本鎖であり得、そしてDNA（ゲノムDNA、cDNAまたは合成DNA）分子あるいはRNA分子であり得る。さらなるコード配列または非コード配列は、本発明のポリヌクレオチド内に存在し得るが、その内に存在する必要はなく、そしてポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持物質に連結され得るが、それらに連結される必要はない。

【0031】

DSP-2ポリヌクレオチドは、ネイティブ配列（すなわち、内因性DSP-2配列あるいはその一部分またはスプライス改変体）を含み得るか、あるいはこのような配列の改変体を含み得る。ポリヌクレオチド改変体は、1つ以上の置換、付加、欠失および/または挿入を含み得、その結果、コードされたポリペプチドの活性が、上記のように実質的に減少しない。コードされたポリペプチドの活性に対する効果は、一般的に、本明細書中に記載されるように評価され得る。改変体は、好ましくは、ネイティブのDSP-2またはその一部分をコードするポリヌクレオチド配列に、少なくとも約70%の同一性、より好ましくは、少なくとも約80%の同一性および最も好ましくは、少なくとも約90%の同一性を示す。パーセント同一性は、Alignアルゴリズム、またはBLASTアルゴリズム(Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; HenikoffおよびHenikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992)のような当業者に周知のコンピュータアルゴリズムを使用して、配列を比較することによって容易に決定され得、このアルゴリズムは、NCBIウェブサイト(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>)で入手可能である。デフォルトのパラメータが使用され得る。特定の改変体は、ネイティブの遺伝子に実質的に相同である。このようなポリヌクレオチド改変体は、適度にストリンジェントな条件下で、ネイティブのDSP-2（または、相補的配列）をコードする天然に存在するDNA配列またはRNA配列とハイブリダイズし得る。適切な適度にストリンジェントな条件は、例えば、5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0)の溶液中で予め洗

浄する工程；50 ~ 70 、5 × S S Cで、1 ~ 16時間（例えば、一晚）ハイブリダイズする工程；その後、70 までで、20 ~ 40分間、0 . 05 ~ 0 . 1% S D Sを含む2 × S S C、0 . 5 × S S Cおよび0 . 2 × S S Cの各々の1つ以上で、1回または2回洗浄する工程を包含する。さらなるストリンジェンシーのために、条件は、50 ~ 70 、15 ~ 40分間の0 . 1 × S S Cおよび0 . 1% S D Sでの洗浄を含み得る。当業者に公知のように、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーの変化は、プレハイブリダイゼーション工程、ハイブリダイゼーション工程および洗浄工程のために使用される溶液の時間、温度および/または濃度を変更することによって達成され得、そして適切な条件はまた、使用されるプローブの特定のヌクレオチド配列、およびプロットィングされた発端者（p r o b a n d）の核酸サンプルの特定のヌクレオチド配列に部分的に依存し得る。従って、適切にストリンジェントな条件は、1つ以上の特定の発端者の配列にハイブリダイズするが、特定の他の発端者の配列にはハイブリダイズしない能力に基づいて、プローブの所望の選択性が同定される場合、過度の実験を伴わずに容易に選択され得ることが認識される。

【0032】

遺伝暗号の縮重の結果として、本明細書中に記載される通りのポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することもまた当業者によって認識される。これらのポリヌクレオチドのうちいくつかは、任意のネイティブな遺伝子のヌクレオチド配列に対して最小の相同性を保有する。それにもかかわらず、コドン使用法の相違に起因して変化するポリヌクレオチドは、本発明によって特に意図される。

【0033】

ポリヌクレオチドは、任意の種々の技術を用いて調製され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、適切な細胞または組織型（例えば、ヒトの胸腺または免疫系細胞）から調製されたc D N Aから増幅され得る。このようなポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）を介して増幅され得る。このアプローチについては、配列特異的プライマーが、本明細書中に提供される配列に基づいて設計され得、そして購入または合成され得る。

【0034】

増幅された部分を用い、周知の技術を用いて全長の遺伝子が適切なライブラリー（例えば、ヒト胸腺cDNA）から単離され得る。このような技術内で、増幅に適切な1以上のポリヌクレオチドプローブまたはポリヌクレオチドプライマーを用いてライブラリー（cDNAまたはゲノム）がスクリーニングされる。好ましくは、ライブラリーは、より大きな分子を含むように大きさが選択される。ランダムプライムライブラリーもまた、遺伝子の5'領域および上流領域を同定するために好適であり得る。ゲノムライブラリーは、イントロンおよび広がる5'配列を得るために好適である。

【0035】

ハイブリダイゼーション技術について、部分配列が、周知の技術を用いて（例えば、ニックトランスレーションまたは³²Pを用いた末端標識によって）標識され得る。次いで、細菌性ライブラリーまたはバクテリオファージライブラリーは、変性した細菌コロニーを含むフィルター（またはファージプラークを含むローン（lawn））を、標識したプローブを用いてハイブリダイズすることによってスクリーニングされ得る（例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参照のこと）。ハイブリダイズするコロニーまたはプラークが選択され、そして増殖され、そしてさらなる分析のためにDNAが単離される。クローンを分析して、例えば、部分配列由来のプライマーおよびベクター由来のプライマーを用いるPCRによってさらなる配列の量が決定され得る。制限地図および部分配列を生成して、オーバーラップする1以上のクローンを同定し得る。周知の技術を用いて適切なフラグメントを連結することによって、全長のcDNA分子を生成し得る。

【0036】

あるいは、部分的cDNA配列から全長のコード配列を得るための多数の増幅技術が存在する。このような技術内では、増幅は一般に、PCRを介して行われる。1つのこのような技術は、「cDNA末端の迅速増幅」、すなわち、RAC

Eとして公知である。この技術は、内部プライマーと、ポリA領域またはベクター配列にハイブリダイズする外部プライマーとを使用して、既知の配列の5'側および3'側である配列を同定することを含む。任意の種々の市販のキットを用いて、増幅工程を行い得る。例えば、当該分野で周知のソフトウェアを使用して、プライマーを設計し得る。プライマーは好ましくは、17~32ヌクレオチド長であり、少なくとも40%のGC含量を有し、そして約54~72の温度で標的配列にアニーリングする。増幅された領域は、上記の通りに配列決定され得、そしてオーバーラップする配列は、連続した配列へと組み立てられ得る。

【0037】

DSP-2をコードするcDNA配列を図1(配列番号1)に提供し、そして推定アミノ酸配列を図2(配列番号2)に提供する。DSP-2の活性部位LHCAGVSR S(配列番号3)は、配列番号1のヌクレオチド位置102~111に位置するヌクレオチド塩基によってコードされる。この部位にすぐ隣接する配列情報を用い、ヒト胸腺cDNAを用いる5'RACE反応および3'RACE反応を設計して、免疫系の組織において非常に多量に提示される188アミノ酸のタンパク質を同定した。このタンパク質を、二重特異性ホスファターゼ-2、すなわち、DSP-2という。図3に示す配列比較によって示されるように、DSP-2は、他のMAPキナーゼホスファターゼに対して有意な相同性を示す。

【0038】

DSP-2ポリヌクレオチド改変体は一般に、例えば、固相化学合成を含む当該分野で公知の任意の方法によって調製され得る。ポリヌクレオチド配列の改変はまた、オリゴヌクレオチド指向性部位特異的変異誘発(oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis)のような標準的な変異誘発技術を用いて導入され得る。あるいは、RNA分子が、DSP-2またはその部分をコードするDNA配列のインビトロまたはインビボでの転写によって生成され得る。但し、このDNAは、適切なRNAポリメラーゼプロモーター(例えば、T7またはSP6)を有するベクターに組み込まれる。特定のポリヌクレオチドを用いて、本明細書中に記載されるよう

に、コードされるポリペプチドを調製し得る。さらに、あるいは、ポリヌクレオチドは、コードされるポリペプチドがインビボで生成されるように、患者に投与され得る。

【0039】

コード配列の少なくとも一部分に相補的であるポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスポリヌクレオチドまたはリボザイム）はまた、プローブまたはプライマーとして使用され得るか、または遺伝子発現を改変するために使用され得る。アンチセンス薬剤としての使用のためのオリゴヌクレオチドおよびリボザイム、ならびにそれらの標的化された送達のための遺伝子をコードするDNAは、当該分野で周知の方法を含む。例えば、このようなオリゴヌクレオチドの所望の特性、長さおよび他の特徴は、周知である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下のような結合を使用することによって、内因性ヌクレオチド分解酵素による分解に耐えるように代表的に設計される：ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、スルホン結合、サルフェート結合、ケチル(ketyl)結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホラミダイト結合、リン酸エステル結合、および他のこのような結合（例えば、Agrwalら, *Tetrahedron Lett.* 28:3539-3542(1987); Millerら, *J. Am. Chem. Soc.* 93:6657-6665(1971); Stecら, *Tetrahedron Lett.* 26:2191-2194(1985); Moodyら, *Nucl. Acids Res.* 12:4769-4782(1989); Uznanskiら, *Nucl. Acids Res.* (1989); Letsingerら, *Tetrahedron* 40:137-143(1984); Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 54:367-402(1985); Eckstein, *Trends Biol. Sci.* 14:97-100(1989); Stein In: *Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*, Cohen, 編, Macmillan Press, London, 頁97-117(1989); Jagerら, *Biochemistry* 27:7237-7246(1988)を参照のこと)。

【0040】

アンチセンスポリヌクレオチドは、配列特異的な様式で、核酸（例えば、mRNAまたはDNA）に結合するオリゴヌクレオチドである。相補的配列を有するmRNAに結合する場合、アンチセンスは、mRNAの翻訳を妨げる（例えば、米国特許第5,168,053号、Altmanら；同第5,190,931号、Inouye,同第5,135,917号、Burch；同第5,087,617号、SmithおよびCluselら（1993）Nucac. Acids Res. 21:3405-3411（これは、垂鈴状（dumbbell）アンチセンスオリゴヌクレオチドを記載する）を参照のこと）。3重鎖分子は、同一線上に並んだ3重鎖分子を形成している2重鎖DNAを結合する単一のDNA鎖をいい、それによって転写を妨げる（例えば、米国特許第5,176,996号、Hoganら（これは、2重鎖DNA上の標的部位に対して結合する合成オリゴヌクレオチドを作製するための方法を記載する）を参照のこと）。

【0041】

特に有用なアンチセンスヌクレオチドおよび3重鎖分子は、DSP-2ポリペプチドまたは内因性DSP-2の発現に関する任意の他のプロセスを媒介するタンパク質をコードするDNAまたはmRNAのセンス鎖と相補的であるか、または結合する分子であり、その結果、DSP-2ポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の阻害がもたらされる。アンチセンスRNA中に転写され得るcDNA構築物はまた、細胞または組織中に導入され、アンチセンスRNAの産生を容易にし得る。アンチセンス技術は、ポリメラーゼ、転写因子または他の調節分子の結合に対する干渉を介して、遺伝子発現を調節するために使用され得る（Geera, In Huber and Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, NY; 1994)を参照のこと）。あるいは、アンチセンス分子は、DSP-2遺伝子の制御領域（例えば、プロモーター、エンハンサーまたは転写開始部位）とハイブリダイズして、そしてこの遺伝子の転写をブロックするようにか；または転写物の、リボソームへの結合を阻害することにより転写をブロックするように設計され得る。

【0042】

本発明はまた、DSP-2-特異的リボザイムを意図する。リボザイムは、RNA基質（例えば、mRNA）を特異的に切断するRNA分子であり、細胞性遺伝子発現に対する特異的な阻害または干渉を生じる。RNA鎖の切断および/またはライゲーションに關与されるリボザイムの少なくとも5つの公知のクラスが存在する。リボザイムは、任意のRNA転写物に標的化され得、そしてこのような転写物を触媒作用的に切断し得る（例えば、米国特許第5,272,262号、同第5,144,019号；および同第5,168,053号、同第5,180,818号、同第5,116,742号および同第5,093,246号、Cechら）。任意のDSP-2 mRNA特異的リボザイム、またはこのようなリボザイムをコードする核酸は、宿主細胞に送達され、DSP-2遺伝子発現の阻害をもたらし得る。従って、リボザイムは、真核生物プロモーター（例えば、真核生物ウイルスプロモーター）に連結されたリボザイムをコードするDNAによって宿主細胞に送達され得、その結果、核中への導入において、リボザイムは直接転写される。

【0043】

任意のポリヌクレオチドは、インビボでの安定性を増大するためにさらに改変され得る。可能な改変としては、これらに限定されないが、5'および/または3'末端におけるフランキング配列の付加；骨格においてホスホジエステル結合以外のホスホロチオエート結合または2'-O-メチル結合の使用；および/または非伝統的(nontraditional)塩基（例えば、イノシン、キエオシンおよびワイプトシン、ならびにアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンのアセチル-、メチル-、チオ-、および他の改変された形態）の封入が挙げられる。

【0044】

本明細書中に記載されるようなヌクレオチド配列は、確立された組換えDNA技術を使用して種々の他のヌクレオチド配列に加えられ得る。例えば、ポリヌクレオチドは、種々のクローニングベクターのいずれか（プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体およびコスミドを含む）中にクローンかされ得る。特定の

目的のベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクターおよび配列決定ベクターが挙げられる。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物体に機能的な複製起点、都合の良い制限エンドヌクレアーゼ部位および1つ以上の選択可能マーカを含む。他のエレメントは、所望される使用に依存し、そして当業者に明らかである。

【0045】

特定の実施形態内で、ポリヌクレオチドは、哺乳動物の細胞中への侵入、およびそこでの発現を可能にするように組み立てられ得る。このような組み立ては、以下の記載のように治療的目的のために特に有用である。当業者は、標的細胞においてポリヌクレオチドの発現を達成するための多く方法が存在し、そして任意の適切な方法が利用され得ることを理解する。例えば、ポリヌクレオチドは、周知の技術を使用して、ウイルスベクター中に取り込まれ得る。ウイルスベクターは、さらに、選択マーカ（形質導入された細胞の同定または選択における助けのため）および/または標的化部分に対する遺伝子（例えば、特異的な標的細胞におけるレセプターに対するリガンドをコードする遺伝子）を移すか、または取り込み得、このベクターを標的的特異的にする。標的化はまた、当業者に公知の方法により、抗体を用いて達成され得る。

【0046】

治療目的のための他の組み立てとしては、コロイド分散系（例えば、高分子複合体、ナノカプセル（nanocapsule）、ミクロスフェア、ビーズ）、ならびに脂質に基づく系（水中油（oil-in-water）乳剤、ミセル、混合されたミセル、およびリポソームを含む）が挙げられる。インビトロおよびインビボの送達ビヒクルとしての使用のための好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち、人工膜小胞）である。このような系の調整および使用は、当該分野で周知である。

【0047】

他の局面の中で、DSP-2プロモーターは、標準的技術を使用して単離され得る。本発明は、このようなプロモーター配列またはその1つ以上のシス-またはトランス-活性化調節エレメントを含む核酸分子を提供する。このような調節

エレメントは、D S P - 2 の発現を増強するかまたは抑制し得る。5' フランキング領域は、本明細書中に提供されるゲノム配列に基づいて、標準的技術を使用して生成され得る。必要な場合、さらなる5' 配列が、P C R に基づく方法または他の標準的方法を使用して生成され得る。5' 領域は、標準的な方法を使用してサブクローン化され、そして配列決定される。プライマー伸長および/または R N a s e 防御分析が使用され、c D N A から推定される転写開始部位を確認し得る。

【0048】

プロモーター領域の境界を規定するために、種々の大きさの、推定上のプロモーターインサートを、プロモーターもエンハンサーも含まない適切なレポーター遺伝子を含む異種発現系にサブクローニングし得る。適切なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌されたアルカリ性ホスファターゼをコードする遺伝子、または緑色蛍光タンパク質遺伝子が挙げられ得る。適切な発現系は周知であり、そして周知の技術を用いて調製され得るか、または市販されている。内部欠失構築物は、独自の内部制限部位を用いるか、または独自ではない制限部位の部分的な消化により、生成し得る。次いで、構築物は、高レベルのD S P - 2 発現を示す細胞にトランスフェクトされ得る。一般に、最小の5' 隣接領域がレポーター遺伝子の最も高い発現レベルを示す構築物は、プロモーターと定義される。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され得、そして薬剤を、D S P - 2 転写を調節する能力について評価するために使用され得る。

【0049】

一旦、機能的プロモーターが同定されると、シス作用エレメントおよびトランス作用エレメントが位置決定され得る。シス作用配列は、一般に、先に特徴付けされた転写モチーフに対する相同性に基づいて、同定され得る。次いで、点変異が、同定された配列内に生成されて、このような配列の調節の役割を評価し得る。このような変異は、部位特異的変異誘発技術またはP C R に基づくストラテジーを用いて、生成され得る。次いで、変更されたプロモーターが、上記のように、レポーター遺伝子発現ベクターにクローニングされ、そしてこの変異の、レポ

ーター遺伝子発現に対する影響が評価される。

【0050】

本発明はまた、DSP - 2の対立遺伝子改変体、ならびに他の生物由来のDSP - 2配列の使用を意図する。このような配列は、一般に、本明細書中に提供される配列に対する類似性（例えば、ハイブリダイゼーション技術を用いて）に基づき、そして本明細書中に提供されるアッセイを用いてDSP - 2活性の存在に基づいて、同定され得る。

【0051】

一般に、本明細書中に記載されるようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、単離される。「単離された」ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとは、その元の環境から除かれたポリペプチドまたはポリヌクレオチドである。例えば、天然に存在するタンパク質は、天然の系において共存する物質のいくらかまたは全てから分離された場合に、単離される。好ましくは、このようなポリペプチドは、少なくとも約90%純粋であり、より好ましくは少なくとも約95%純粋であり、そして最も好ましくは少なくとも約99%純粋である。ポリヌクレオチドは、例えば、天然の環境の一部ではないベクターにクローニングされる場合に、単離されたとみなされる。

【0052】

(DSP - 2活性を検出するためのアッセイ)

本発明に従って、DSP - 2の基質は、全長チロシンリン酸化タンパク質およびポリペプチド、ならびにチロシン残基においてリン酸化され得、そして特定の好ましい実施形態においてはまたセリン残基またはスレオニン残基においてリン酸化を起こすことが可能であり得るそのフラグメント（例えば、部分）、誘導体またはアナログを含み得る。このようなフラグメント、誘導体およびアナログとしては、例えばDSP - 2と複合体を形成することによって、本明細書中に提供されるようなDSP - 2と相互作用する生物学的機能を少なくとも維持する、任意の天然に存在するかまたは人工的に操作されたDSP - 2基質ポリペプチドが挙げられる。DSP - 2基質ポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログ（融合タンパク質である基質を含む）は、以下のいずれかであり得る：(i)

1つ以上のアミノ酸残基が、保存アミノ酸残基もしくは非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）と置換され、そしてこのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝コードによりコードされてもコードされなくてもよいアミノ酸残基であるもの、または(i i) 1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(i i i) 基質ポリペプチドが別の化合物（例えば、そのポリペプチドの半減期を増加させる化合物（例えば、ポリエチレングリコール）、またはレポーター分子のような検出可能部分）と融合されたもの、または(i v) さらなるアミノ酸（基質のポリペプチドまたはプロタンパク質配列の精製のために使用されるアミノ酸を含む）が基質のポリペプチドに融合したもの。このようなフラグメント、誘導体およびアナログは、当業者の範囲内であるとみなされる。好ましい実施形態において、MAPキナーゼポリペプチドは、本明細書中に提供されるような使用のための基質である。

【0053】

DSP-2ポリペプチド改変体は、MAPキナーゼホスファターゼ活性に適した任意のアッセイを用いて、DPS-2活性について試験され得る。このようなアッセイは、インビトロでか、または細胞に基づくアッセイにおいて、実施され得る。例えば、MAPキナーゼは、本明細書中に提供されるようなDSP-2基質として使用するために、Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY; カタログ番号14-198) から不活化形態として得られ得る。MAPキナーゼのリン酸化は、周知の技術（例えば、ZhengおよびGuan、J. Biol. Chem. 268:16116-16119、1993により記載されるもの）を使用して、MAPキナーゼキナーゼMEK-1 (Upstate Biotechnology; カタログ番号14-206 から入手可能) を用いて、実施され得る。

【0054】

例えば、[³²P]で放射線標識した基質（例えば、MAPキナーゼ）を、放射線標識された活性化MAPキナーゼを生じるキナーゼ反応のために、使用し得る。次いで、DSP-2ポリペプチドは、このDSP-2ポリペプチドをMAPキナーゼと適切な条件下（例えば、Tris (pH 7.5) 1mM EDTA、

1 mMジチオトレイトール、1 mg/mLウシ血清アルブミン、30 で10分間；またはZhengおよびGuan、J. Biol. Chem. 268:16116-16119、1993により記載されるような)で接触させることにより、活性化MAPキナーゼを脱リン酸化する能力について試験され得る。MAPキナーゼの脱リン酸化は、種々のアッセイ(例えば、連結キナーゼアッセイ(当該分野において一般的に公知の任意のアッセイを用いて、MAPキナーゼ基質のリン酸化を評価する))のいずれかを用いるか、または直接的に((1)放射性リン酸基の損失(例えば、電気泳動、続いてオートラジオグラフィーによる)；(2)脱リン酸化の後の電気泳動移動度のシフト；(3)ホスホチロシンまたはホスホスレオニンに対して特異的な抗体との反応性の損失；あるいは(4)MAPキナーゼのホスホアミノ酸分析に基づく)、検出され得る。特定のアッセイは、一般に、Wardら、Nature 367:651-654、1994、またはAlessiら、Oncogene 8:2015-2020、1993により記載されるように実施され得る。一般に、500 pg~50 ngのDSP-2ポリペプチドと、100 ng~100 µgの活性MAPキナーゼとの接触は、MAPキナーゼの検出可能な脱リン酸化を、代表的には20~30分以内に生じるべきである。特定の実施形態においては、0.01~10単位/mL(好ましくは約0.1単位/mLであり、ここで単位とは、1分間あたり1 nmolの基質を脱リン酸化するに十分な量である)のDSP-2ポリペプチドが、0.1~10 µM(好ましくは約1 µM)の活性MAPキナーゼと接触されて、MAPキナーゼの検出可能な脱リン酸化を生じ得る。好ましくは、DSP-2ポリペプチドは、MAPキナーゼの脱リン酸化、または相当する量のネイティブなヒトDSP-2の存在下で観察される脱リン酸化と少なくとも同程度のリン酸化基質(例えば、チロシンリン酸化ペプチドおよび/またはセリンリン酸化ペプチド)を生じる。本明細書中に記載のような変異をトラップする基質を使用して同定される他の基質が、このようなアッセイにおいてMAPキナーゼと置換され得ることが、明らかである。

【0055】

(抗体および抗原結合フラグメント)

DSP - 2 に特異的に結合する、ペプチド、ポリペプチドおよび他の非ペプチド分子もまた、本発明により意図される。本明細書中で使用される場合、ある分子が検出可能なレベルで DSP - 2 と反応し、そして関連しない配列または異なる二重特異的ホスファターゼの配列を含むペプチドとは検出可能に反応しない場合に、この分子は DSP - 2 に「特異的に結合する」といわれる。このような結合特性は、一般に、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) などを使用して評価され得、これは、当業者により容易に実施され得る。好ましい結合分子としては、抗体 (これは、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、一本鎖、キメラ、抗イデオタイプ、または CDR 移植されたものの、いずれでもよい) が挙げられる。特定の好ましい抗体は、本明細書中に記載されるように、インビトロアッセイにおいて DSP - 2 活性を阻害またはブロックする抗体である。

【0056】

抗体は、一般的に、抗原として単離されたネイティブな DSP - 2 タンパク質または組換え DSP - 2 タンパク質を使用して種々の技術のいずれかによって調製され得る。このような技術は、当業者に公知である (例えば、Harlow および Lane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988 を参照のこと)。1つのこのような技術において、DSP - 2 ポリペプチドを含む免疫原が、最初に適切な動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、およびヤギ) に、好ましくは、1回以上の追加免疫を含む所定のスケジュールに従って注射され、そしてその動物が周期的に出血される。次いで、このポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、例えば、適切な固体支持体に結合されたポリペプチドを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、このような抗血清から生成され得る。

【0057】

DSP - 2 またはその改変体に特異的なモノクローナル抗体は、例えば、Kohler および Milstein、Eur. J. Immunol. 6: 511 - 519, 1976 の技術およびその改善方法を使用して調製され得る。手短には、これらの方法は、所望の特異性 (すなわち、目的のポリペプチドとの反応性)

を有する抗体を産生し得る不死細胞株の調製を含む。このような細胞株は、例えば、上記のように免疫された動物から得られた脾臓細胞から産生され得る。次いで脾臓細胞は、例えば、ミエローマ細胞融合パートナー（好ましくは、免疫された動物と同系であるパートナー）との融合によって不死化される。例えば、脾臓細胞およびミエローマ細胞は、数分間、非イオン性界面活性剤と合わせられ得、次いでハイブリッド細胞の増殖を支持するが、ミエローマ細胞の増殖を支持しない選択培地上で低密度でプレートされ得る。好ましい選択技術は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）選択を使用する。十分な時間（普通約1～2週間）の後に、ハイブリッドのコロニーが観測される。単一のコロニーが選択され、ポリペプチドに対する結合活性について試験される。高い反応性および特異性を有するハイブリドーマが好ましい。DSP-2に対して特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが、本発明に意図される。

【0058】

モノクローナル抗体は、増殖ハイブリドーマコロニーの上清から単離され得る。さらに、種々の技術（例えば、マウスのような適切な脊椎動物宿主の腹腔へのハイブリドーマ細胞株の注射）が、収率を高めるために使用され得る。次いで、モノクローナル抗体は、腹水または血液から収集され得る。汚染物質は、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈澱、および抽出のような従来技術によって抗体から除去され得る。

【0059】

特定の実施形態において、抗体の抗原結合フラグメントの使用が好ましい。このようなフラグメントには、Fabフラグメントが含まれ、これは、標準的な技術を使用して（例えば、FabフラグメントおよびFcフラグメントを産生するためにパパインを用いる消化によって）、調製され得る。FabフラグメントおよびFcフラグメントは、標準的な技術を使用して、アフィニティークロマトグラフィーによって（例えば、タンパク質Aビーズカラムで）分離され得る。

【0060】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、DSP-2ポリペプチドのアフィニティ単離のために使用され得る。ポリペプチドのアフィニティ精製の

ための技術は、当該分野において周知である（例えば、Hermanson, G. T.ら、「Immobilized Affinity Ligand Techniques」、Academic Press, Inc. (New York, 1992)を参照のこと）。手短には、その抗体または抗原結合フラグメントは、固体支持体材料上に固定化され得、次いで、この支持体材料は目的のポリペプチドを含むサンプルと接触される。サンプルの残りからの分離に続いて、次いでこのポリペプチドは、固定化された抗体から放出される。

【0061】

(DSP-2発現を検出するための方法)

本発明の特定の局面は、診断およびアッセイの目的のために、DSP-2またはハイブリダイズポリペプチドに対して惹起された抗体を使用する方法を提供する。特定のアッセイは、DSP-2、またはそのタンパク質分解フラグメントの存在または非存在を検出するために抗体または他の薬剤を使用することを含む。あるいは、DSP-2をコードする核酸は、標準的なハイブリダイゼーションおよび/またはPCR技術を使用して検出され得る。適切なプローブおよびプライマーは、本明細書に提供されるDSP-2 cDNA配列に基づいて、当業者によって設計され得る。アッセイは、一般的に、真核生物細胞、バクテリア、ウイルス、このような生物から調製された抽出物および生きている生物において見出される流体のような生物学的供給源から得られる種々のサンプルのいずれかを使用して行われ得る。患者から得られ得る生物学的サンプルには、血液サンプル、生検検体、組織外植片、器官培養物および他の組織または細胞調製物が挙げられる。患者または生物学的供給源は、ヒトまたは非ヒト動物、一次細胞培養物または培養適合細胞株であり得、これには、遺伝的に操作された細胞株（染色体的に組み込まれたかまたはエピソーム的に組換えられた核酸配列を含み得る）、不死化または不死化可能細胞株、体細胞ハイブリッド細胞株、分化されたまたは分化可能な細胞株、形質転換された細胞株などが挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい実施形態において、患者または生物学的供給源は、ヒトであり、特に好ましい実施形態において、生物学的供給源は、哺乳動物である非ヒト動物（例えば、ゲッ歯動物（例えば、マウス、ラット、ハムスターなど）、有蹄

動物（例えば、ウシ）または非ヒト霊長類）である。本発明の特定の他の好ましい実施形態において、患者は、変化した細胞性信号伝達と関連した疾患を有すると疑われ得るかまたはその危険にあると疑われ得る、あるいは、疾患のような危険がないかまたはその存在がないことが既知であり得る。

【0062】

DSP-2タンパク質を検出するために、試薬は代表的には抗体であり、この抗体は、以下に記載されるように調製され得る。サンプル中のポリペプチドを検出するための抗体を使用するための、当業者に公知の種々のアッセイ形式がある。例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。例えば、このアッセイは、ウェスタンブロット形式で実行され得、この形式において、生物学的サンプルからのタンパク質調製物を、ゲル電気泳動により分離し、適切な膜に移し、そして抗体と反応させる。次いで、膜上の抗体の存在は、以下に記載されるような適切な検出試薬を用いて検出され得る。

【0063】

別の実施形態において、アッセイは、固体支持体上に固定された抗体を使用し、標的DSP-2に結合させ、そしてサンプルの残りから取り除くことを包含する。次いで結合されたDSP-2は、レポーター基を含む第2の抗体または試薬を用いて検出され得る。あるいは、競合アッセイが利用され得る。この競合アッセイにおいて、DSP-2ポリペプチドを、レポーター基で標識し、そしてサンプルと共に抗体をインキュベートした後に固定化抗体に結合させる。このサンプルの成分が標識化ポリペプチドの抗体への結合を阻害する程度は、このサンプルの固定化抗体との反応性を示し、そして結果として、サンプル中のDSP-2のレベルを示す。

【0064】

固体支持体は、抗体が結合され得る、当業者に公知の任意の材料（例えば、マイクロタイタープレートにおける試験ウェル、ニトロセルロースフィルターまたは別の適切な膜）であり得る。あるいは、支持体は、ビーズまたは円板（例えば

、ガラス)、ファイバーガラス、ラテックスまたはプラスチック(例えば、ポリスチレンまたはポリビニルクロリド)であり得る。当業者に公知の種々の技術(特許および科学文献に豊富に記載される)を使用して、抗体は、固体支持体上に固定化され得る。

【0065】

特定の実施形態において、サンプル中のDSP-2の検出のためのアッセイは、2つの抗体のサンドイッチアッセイである。このアッセイは、第1に固体支持体(一般的にはマイクロタイタープレートのウェル)上に固定化された抗体を生物学的サンプルと接触させる工程により実行され得、その結果、サンプル内のDSP-2は、固定化抗体に結合することが可能になる(室温での30分間のインキュベーション時間が、一般的に充分である)。次いで、結合されないサンプルを、固定化DSP-2/抗体複合体から除去し、そしてDSP-2上の異なる部位に結合し得る第2の抗体(酵素、色素、放射性核種、発光基、蛍光基、またはビオチンのようなレポーター基を含む)を添加する。次いで、固体支持体に結合したままの第2の抗体の量を、特異的レポーター基に適切な方法を用いて決定する。放射性基については、シンチレーション計数またはオートラジオグラフィ法が、一般的に適切である。分光法を使用して、色素、発光基、および蛍光基を検出し得る。ビオチンを、異なるレポーター基(一般的に放射性基もしくは蛍光基または酵素)に結合された、アビジンを使用して検出し得る。酵素レポーター基を、一般的には基質を(一般的に特異的な期間)添加し、次いで、反応産物の分光分析または他の分析することにより検出し得る。周知の技術を使用して、サンプル中のDSP-2のレベルを決定するために、標準および標準添加物を使用し得る。

【0066】

本発明の関連する局面において、DSP-2およびDSP-2ホスファターゼ活性を検出するためのキットが提供される。このようなキットは、DSP-2もしくはDSP-2をコードする核酸のレベルを検出するために設計され得るか、または直接ホスファターゼアッセイもしくは結合ホスファターゼアッセイにおいて、DSP-2のホスファターゼ活性を検出し得る。一般的には、本発明のキッ

トは、アッセイにおいて使用される要素（例えば、試薬または緩衝液）を封入した1つ以上の容器を含む。

【0067】

DSP - 2、またはDSP - 2をコードする核酸のレベルを検出するためのキットは、代表的にはDSP - 2タンパク質、DSP - 2 DNAまたはDSP - 2 RNAに結合する試薬を含む。DSP - 2をコードする核酸を検出するために、試薬は、核酸プローブまたはPCRプライマーであり得る。DSP - 2タンパク質を検出するために、試薬は、代表的には抗体である。このようなキットはまた、試薬の直接的または間接的検出に適したレポーター基を含む（すなわち、レポーター基は、この試薬に共有結合で結合されるか、または第2の分子（例えば、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリンまたはレクチン）に結合し得、この第2の分子自身が、試薬に結合し得る）。適切なレポーター基としては、酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ）、基質、補因子、インヒビター、色素、放射性核種、発光基、蛍光基およびビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。このようなレポーター基は、当業者に公知の標準的な方法を使用して、サンプル成分に対する試薬の結合を直接的または間接的に検出するために使用され得る。

【0068】

DSP - 2活性を検出するためのキットは、代表的には適切な緩衝液と組合せたDSP - 2基質を含む。DSP - 2活性は、上記のようなホスファターゼアッセイを行う前に、DSP - 2特異的抗体を用いて免疫沈降工程を実施することにより特異的に検出され得る。基質の脱リン酸化を検出する際の使用のための他の試薬もまた提供され得る。

【0069】

特定の診断アッセイにおいて、変更されたDSP - 2の存在または変更されたレベルのDSP - 2発現に基づいて、増殖障害は、患者または本明細書中に提供されるような別の生物学的供給源生物体において、検出され得る。例えば、抗体は、野生型DSP - 2とアミノ酸配列におけるバリエーションを有する変更されたDSP - 2とを識別し得る。このようなバリエーションは、増殖障害の存在、

またはこのような障害の罹患性を示し得る。ハイブリダイゼーションおよび増幅技術は、同様に改変DSP-2配列を検出するために使用され得る。

【0070】

(DSP-2活性のモジュレーターを同定するための方法)

本発明の1つの局面において、DSP-2ポリペプチドは、DSP-2活性を調節する薬剤を同定するために使用され得る。このような薬剤は、MAP-キナーゼカスケードを介するシグナル変換を阻害または増強し、細胞増殖を引き起こし得る。DSP-2活性を調節する薬剤は、DSP-2の発現および/もしくは安定性、DSP-2タンパク質活性ならびに/または基質を脱リン酸化するDSP-2の能力を変化させ得る。このようなアッセイにおいてスクリーニングされ得る薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体およびその抗原結合フラグメント、例えば、触媒部位または二重リン酸化モチーフを提示する競合基質またはペプチド、DSP-2の転写および/または翻訳を妨害するアンチセンスポリヌクレオチドおよびリボザイム、ならびにDSP-2に結合し、そしてDSP-2を不活化する他の天然分子および合成分子（例えば、小分子インヒビター）。

【0071】

本発明に従うDSP-2のモジュレーターをスクリーニングする方法における使用のための候補薬剤は、「ライブラリー」または化合物、組成物もしくは分子の収集として提供され得る。このような分子は、代表的には、当該分野において「小分子」として知られ、そして 10^5 ダルトン未満、好ましくは 10^4 ダルトン未満、そしてなおより好ましくは、 10^3 ダルトン未満の分子量を有する化合物を含む。例えば、試験化合物のライブラリーのメンバーは、本明細書中に提供されるような少なくとも1つのDSP-2ポリペプチドを各々含む、複数のサンプルに投与され得、次いで基質のDSP-2媒介脱リン酸化または基質へのDSP-2媒介結合を増強または阻害するそれらの能力についてアッセイされる。DSP-2機能（例えば、ホスホチロシンおよび/またはホスホセリン/スレオニン脱リン酸化）に影響を与え得るとしてこのように同定された化合物は、治療目的および/または診断目的のために役立つ。なぜなら、これらは、DSP-2活性

に関連する疾患の処置および/または検出を可能にするからである。このような化合物はまた、DSP-2に關与する分子シグナル伝達機構に關する研究、およびさらなる特異性を示す将来のDSP-2化合物の発見および開発における改良に關する研究において役立つ。

【0072】

候補薬剤はさらに、コンビナトリアルライブラリーのメンバーとして提供され得、これは、好ましくは、複数の反応容器中で行われる所定の複数の化学反応に従って調製された合成薬剤を含む。例えば、種々の出発化合物は、1以上の固相合成、記録されたランダム混合手順および記録された反応分割手段を利用して調製され得、これらは、所定の構成が、複数の順列および/または組み合わせの反応条件を帰属可能に受けることを可能にする。得られる生成物は、スクリーニングされ得、次いで反復の選択および合成手順をされ得るライブラリー（例えば、ペプチド（例えば、PCT/US91/08694、PCT/US91/04666（これらは、本明細書中でその全体を参考として援用される）を参照のこと）または本明細書中で提供されるような小分子を含み得る他の組成物（例えば、PCT/US94/08542、EP 0774464、米国特許第5,798,035号、米国特許第5,789,172号、米国特許第5,751,629号（これらは、本明細書中でその全体を参考として援用される）を参照のこと）の合成コンビナトリアルライブラリー）を構成する。このようなライブラリーの多様な分類は、確立された手順に従って調製され得、そして本開示に従うDSP-2を用いて試験され得ることを、当業者は理解する。

【0073】

特定の実施形態においては、調節薬剤は、候補薬剤を、DSP-2ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、インビトロまたはインビボで組み合わせ、そして候補薬剤のDSP-2ホスファターゼ活性に対する効果を、例えば、本明細書中に記載される代表的なアッセイを用いて評価することによって同定され得る。ホスファターゼ活性における増加または減少は、候補薬剤の存在下および非存在下で、本明細書中に提供される代表的なアッセイを行うことによって測定され得る。手短には、候補薬剤は、活性DSP-2

ポリペプチドと基質（例えば、リン酸化MAP - キナーゼ）の混合物中に、この混合物の1以上の成分とのブレインキュベーションありまたはなしで含まれ得る。一般的に、抗体またはこのようなアッセイにおける使用のための他の薬剤の適切な量は、約0.01 μ M ~ 約100 μ Mの範囲である。次いで、薬剤のDSP - 2活性への効果は、基質からのホスフェートの損失を定量化し、そしてその損失を、候補薬剤の添加なしでDSP - 2を用いて達成された損失と比較することによって評価され得る。あるいは、結合キナーゼアッセイが使用され得、このアッセイにおいてDSP - 2活性は、MAP - キナーゼ活性に基づいて間接的に測定される。

【0074】

あるいは、DSP - 2コード領域またはレポーター遺伝子と作動可能に連結されたDSP - 2プロモータを含むポリヌクレオチドは、試験化合物のDSP - 2転写への影響を評価するために使用され得る。このようなアッセイは、DSP - 2を内因的に発現する細胞（例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物の胸腺細胞または免疫系細胞）またはレポーター遺伝子と作動可能に連結したDSP - 2プロモータを含む発現ベクターでトランスフェクトされた細胞において行われ得る。次いで、試験化合物の効果は、DSP - 2またはレポーターの転写への効果を、例えば、ノーザンブロット分析または適切なレポーター活性アッセイを用いてアッセイすることによって評価され得る。

【0075】

DSP - 2活性はまた、その発現が適切な基質の活性化に依存するレポーター遺伝子でトランスフェクトした全細胞において測定され得る。例えば、適切な細胞（すなわち、DSP - 2を発現する細胞）は、レポーター遺伝子と連結された基質依存性プロモータでトランスフェクトされ得る。このような系において、レポーター遺伝子の発現（これは、当業者に周知の方法を用いて容易に検出され得る）は、基質の活性化に依存する。基質の脱リン酸化は、レポーター活性における減少に基づいて検出され得る。候補調節薬剤は、上記のようにこのような系に添加され得、DSP - 2活性に対するそれらの効果を評価する。

【0076】

本発明はさらに、DSP-2と相互作用するか、またはDSP-2に結合する分子を同定するための方法を提供する。このような分子は、一般的に、少なくとも 10^4 、好ましくは、少なくとも 10^5 、より好ましくは、少なくとも 10^6 、なおより好ましくは、少なくとも 10^7 、そして最も好ましくは、少なくとも 10^8 の親和力定数(K_d)を有するDSP-2と会合する。親和力定数は、周知の技術を用いて決定され得る。相互作用分子を同定するための方法は、例えば、調節薬剤についての最初のスクリーニングとして、またはインビボでのDSP-2活性に関与する因子を同定するために使用され得る。基質捕捉のための技術(例えば、上記のようなDSP-2変異体または基質捕捉変異体を用いる)はまた、本明細書中で提供される特定の実施形態に従って意図される。標準的な結合アッセイに加えて、相互作用分子を同定するために周知である多くの他の技術(酵母2ハイブリッドスクリーニング、ファージディスプレイおよび親和力技術を含む)が存在する。このような技術は、慣用的なプロトコルを用いて行われ得、これらのプロトコルは当業者に周知である(例えば、Bartelら、Cellular Interactions in Development: A Practical Approach、D.A. Harley(編)、Oxford University Press(Oxford, UK)、153~179頁、1993を参照のこと)。これらおよび他の技術においては、候補相互作用タンパク質(例えば、推定DSP-2基質)は、DSP-2結合タンパク質またはDSP-2相互作用タンパク質の存在についてアッセイする前に、リン酸化され得る。

【0077】

他の局面においては、本発明は、動物が機能的なDSP-2の発現も、変化したDSP-2の発現もしない、動物モデルを提供する。このような動物は、標準的な相同組換え戦略を用いて産生され得る。この様式で産生された動物モデルは、DSP-2ポリペプチドの活性およびインビボでの調節薬剤を研究するために使用され得る。

【0078】

(基質を脱リン酸する方法)

本発明の別の局面において、DSP-2ポリペプチドは、本明細書中で提供されるDSP-2の基質を脱リン酸するために使用され得る。1つの実施形態において、基質は、30分で10分間、適切な緩衝液（例えば、Tris、pH7.5、1mM EDTA、1mM ジチオスレイトール、1mg/mL ウシ血清アルブミン）中で基質とともにDSP-2ポリペプチドをインキュベートすることで、インビボで脱リン酸され得る。MAPキナーゼのような、DSP-2によって脱リン酸され得る任意の化合物が、基質として使用され得る。一般に、反応成分の量は、約50pg~約50ngのDSP-2ポリペプチドにわたり、そして約10ng~約10μgの基質にわたり得る。次いで、脱リン酸された基質は、例えば、親和性技術および/またはゲル電気泳動によって精製され得る。基質の脱リン酸の程度は、[³²P]標識化基質を試験アリコートに添加し、そして本明細書中に記載されるように基質の脱リン酸のレベルを評価することによって、一般にモニターされ得る。

【0079】

（細胞応答を調節する方法）

調節剤は、インビボおよびインビトロの両方の種々の状況における、細胞の増殖、分化および生存のような細胞応答を、調節、改変またはさもなくば変化（例えば、増加または減少）するために使用され得る。一般に、このような応答を調節（例えば、増加または減少）するために、細胞は、DSP-2活性の調節を可能にするのに十分な時間および条件下で、DSP-2活性を調節する薬剤に接触される。細胞応答を調節する薬剤は、種々の方法の任意において機能し得る。例えば、薬剤は、遺伝子発現のパターンを調節し得る（すなわち、協調的様式で発現される遺伝子ファミリーまたは遺伝子の発現を増大または阻害し得る）。種々のハイブリダイゼーションおよび増幅の技術は、遺伝子発現のパターンを評価するために利用可能である。あるいは、またはさらに、薬剤は細胞のアポトーシスまたは壊死をもたらし得、そして/または細胞内の細胞サイクルの機能を調節し得る。（例えば、Ashkenaziら、1998 Science、281:1305; Thornberryら、1998 Science 281:1312; Evanら、1998 Science 281:1317; Adams

ら、1998 Science 281:1322 ; および本明細書中に列挙される参考文献を参照のこと。)

上記のように処置された細胞は、変化した増殖、分化または生存特性を有する細胞の標準的特徴を示し得る。さらに、このような細胞は、細胞増殖の接触阻害、足場非依存性増殖または改変された細胞内接着のような、他の検出可能な特性における変化を示し得る(しかし、必要とはされない)。このような特性は、当業者が精通した技術を使用して容易に検出され得る。

【0080】

(治療方法)

1つ以上のDSP-2ポリペプチド、調節剤および/またはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/または調節剤はまた、患者においてDSP-2活性を調節するためにも使用され得る。本明細書中で使用される場合、「患者」は、任意の哺乳動物(ヒトを含む)であり得、そしてDSP-2活性に関連した状態に冒され得るか、または検出可能な疾患を有さないものであり得る。従って、処置は、存在する疾患の処置であり得るか、または予防的であり得る。DSP-2活性に関連する状態としては、細胞増殖(癌、対宿主性移植片病(GVHD)、自己免疫傷害、アレルギーまたは免疫抑制が関与し得る他の状態を含む)、代謝病、異常細胞増殖または異常細胞分化、および細胞サイクル異常に関連する任意の傷害が挙げられ得る。このような特定の傷害は、正常なMAPキナーゼのホスファターゼ活性の損失に関連し、非制御細胞増殖を導く。DSP-2ポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、このような傷害を回復させるために使用され得る。DSP-2のアクチベーターはまた、移植された器官または移植片の拒絶を阻害し得る。このような用途として、DSP-2のアクチベーターは、好ましくは移植または移植片の部位に投与される。

【0081】

患者への投与のために、1つ以上のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/または調節剤が、薬学的組成物として一般に処方される。薬学的組成物は、滅菌した水溶液または非水溶液、懸濁液または乳濁液であり得、これはさらに生理学

的に受容可能なキャリア（すなわち、活性成分の活性に干渉しない非毒性物質）を含む。このような組成物は、固体、液体または気体（エアロゾル）の形態であり得る。あるいは、本発明の組成物は、凍結乾燥物として処方され得るか、または化合物は、周知の技術を使用してリポソーム内にカプセル化され得る。本発明の範囲内の薬学的組成物はまた、他の成分を含み得、これらは生物学的に活性であるか、または不活性であり得る。このような成分としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：緩衝液（例えば、中性緩衝生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水）、炭水化物（例えば、ブドウ糖、マンノース、ショ糖またはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、またはグリシンのようなアミノ酸、抗酸化剤、EDTAまたはグルタチオンのようなキレート化剤、安定剤、色素、矯味矯臭剤、および懸濁剤および/または保存剤。

【0082】

当業者に公知の任意の適切なキャリアは、本発明の薬学的組成物において使用され得る。治療的使用のためのキャリアは周知であり、そして例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro 編 1985) に記載される。一般に、キャリアの型は、投与の形態に基づいて選択される。薬学的組成物は、投与（例えば、局所的、経口、経鼻、クモ膜下内、直腸、膣、舌下、または非経口（皮下、静脈内、筋肉内、胸骨下（intrasternal）、空洞内、道内（intrameatal）、または尿道内の注射あるいは注入が挙げられる）投与が挙げられる）の任意の適切な様式のために処方され得る。非経口投与について、このキャリアは、好ましくは水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックスまたは緩衝液を含む。経口投与について、上記の任意のキャリアまたは固体キャリア（例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、滑石粉、セルロース、カオリン、グリセリン、デンプンデキストリン、アルギニン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、ブドウ糖、ショ糖、および/または炭酸マグネシウム）が使用され得る。

【0083】

薬学的組成物（例えば、経口投与または注射による送達のための）は、液体形態（例えば、エリキシル、シロップ、溶液、乳濁液または懸濁液）であり得る。液体の薬学的組成物としては、例えば以下の1つ以上が挙げられ得る：注射のための水、食塩水、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒体として役立つ合成のモノまたはジグリセリドのような揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベン（p a r a b e n）のような抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート化剤；アセテート、シトレートまたはホスフェートのような緩衝液および塩化ナトリウムまたはブドウ糖のような張性の調節のための薬剤。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックで作製されたアンプル、使い捨てシリンジまたは複数の用量バイアルに同封され得る。生理食塩水の使用が好ましく、そして注射可能な薬学的組成物は、好ましくは滅菌されている。

【0084】

本明細書中に記載された組成物は、持続放出のために処方され得る（すなわち、投与によって化合物の緩やかな放出をもたらすカプセルまたはスポンジのような処方物）。このような組成物は、一般的には周知の技術を用いて調製され得、そして例えば、経口、直腸または皮下埋め込み術によってか、または所望の標的部への移植によって投与され得る。持続放出处方物は、キャリアマトリックスにおいて分散され、そして/または速度制御膜によって囲まれたリザーバ内に含まれる薬剤を含み得る。このような処方物内での使用のためのキャリアは、生体適合性であり、そしてまたは生分解性であり得る；好ましくは、この処方物は、活性成分の放出の比較的一定のレベルを提供する。持続放出处方物に含まれる活性成分の量は、移植の部位、放出の速度および予期される持続期間ならびに処置または予防される状態の体質に依存する。

【0085】

D S P - 2 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/または調節因子（ポリペプチドおよび/または調節因子は、インサイチュで生成されるように

)を含有する薬学的組成物に関して、このポリヌクレオチドは、核酸ならびに、細菌発現系、ウイルス発現系および哺乳動物発現系を含む、当業者に公知の種々の送達系のいずれかに存在され得る。このような発現系にDNAを取り込むための技術は、当業者に周知である。このDNAはまた、例えば、Ulmerら、*Science* 259:1745-1749, 1993に記載およびCohen, *Science* 259:1691-1692, 1993によって概説されるように「裸」であり得る。裸のDNAの取り込みは、細胞に効果的に輸送される生分解性ビーズ上にDNAを被覆することによって上昇され得る。

【0086】

薬学的組成物内の、DSP-2ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは調節因子は、種々の化合物のいずれかに連結され得る。例えば、このような因子は、因子の標的部位への送達を容易にする標的化部分（例えば、モノクロナール抗体またはポリクロナール抗体、タンパク質またはリポソーム）に連結され得る。本明細書中で使用される場合「標的化部分」は、任意の物質（例えば、化合物または細胞）であり得、薬剤の標的細胞または組織への輸送を増大する因子と連結された場合、それによってこの薬剤の局所的な濃度を上昇する。標的化部分としては、抗体またはそのフラグメント、レセプター、リガンドならびに標的組織の細胞に結合する他の分子、または標的組織の近位の細胞に結合する他の分子が挙げられる。抗体標的化因子は、インタクト（全て）な分子、そのフラグメント、またはその機能的な等価物であり得る。抗体フラグメントの例としては、 $F(ab')_2$ 、 $-Fab'$ 、 Fab および $F[v]$ フラグメントであり、これらは、従来の方法によってか、または遺伝子工学もしくはタンパク質工学によって産生され得る。結合は、一般的には、共有結合であり、そして例えば、直接縮合または他の反応によってか、二機能性リンカーまたは多機能性リンカーを手段として達成される。標的化部分は、薬剤が治療的利点を発揮すると予期される、細胞または組織に基づいて選択され得る。

【0087】

薬学的組成物は、治療（または予防）される疾患に適切な様式で投与され得る。適切な投与量ならびに投与の適切な持続期間および頻度は、患者の状態、患者

の疾患の型および重篤性、活性成分の特定の形態および投与の方法のような因子によって決定される。一般的には、適切な投与量および処置レジメンは、治療的利点および/または予防的利点(例えば、より多くの完全な寛解または部分的な寛解、または長期の無疾患および/または全体的な生存者のような臨床的な成果を向上させる)を提供するのに十分な量で薬剤を提供する。予防的な使用に関して、投与量は、細胞増殖に関連する疾患の兆候を予防、遅延、またはこれの重篤性を減少するのに十分でなければならない。

【0088】

最適な投与量は、一般的には、実験的なモデルおよび/または臨床的な試みを用いて決定され得る。一般的には、用量において存在するポリペプチドの量または用量において存在するDNAによってインサイチュで産生されるポリペプチドの量は、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 宿主~約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 宿主、代表的には約0.1 μg ~約10 μg の範囲である。効果的な治療を提供するのに十分な最少用量の使用は、通常好ましい。患者は、一般的には、当業者に公知である処置または予防される状態について適切なアッセイを用いて治療有効性または予防有効性についてモニタされ得る。適切な用量サイズは、患者の大きさに伴って変化するが、代表的には、10~60 kgの動物に対して約10 mL ~約500 mLの範囲である。

【0089】

以下の実施例は、例示の目的で提示するが、限定の目的ではない。

【0090】

(実施例)

(実施例1)

(DSP-2をコードするcDNAのクローニングおよび配列決定)

本実施例は、ヒトDSP-2をコードするcDNA分子のクローニングを示す。

【0091】

二重特異性(dual-specificity)ホスファターゼの活性部位ドメインの周囲の保存配列モチーフを以下のように同定した:二重特異性ホスフ

アターゼは、タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) のより大きいファミリーに属する。これは、5つの可変アミノ酸ストレッチのN末端に位置するシステイン残基、それに続くアルギニン残基を含む保存された触媒性ドメインを共有する (Faumanら、Trends In Bioch. Sci. 21:413~417、1996)。DSPは、代表的に、PTP活性部位モチーフを含むが、他の領域においてはPTPに対する配列相同性を欠いている (Jia, Biochem. and Cell Biol. 75:17~26, 1997)。しかし、DSPの間で保存されているコンセンサス配列は、報告されておらず、上記に言及されたような公知のDSP配列の試験から明白なコンセンサス領域も報告されていない。新しいDSPファミリーメンバーの同定に有用な、より長いコンセンサスDSPアミノ酸配列モチーフを誘導するために、複数の公知の二重特異性ホスファターゼ配列を整列させ、比較した。MAP-キナーゼホスファターゼ活性を有する8つのヒトDSP由来の8つのアミノ酸配列の整列により、PTP活性部位サインモチーフを含む23のアミノ酸ペプチド配列から構成される保存された相同性領域を得た。従って、以下の配列: GRVLVHCQAGISRSGTNI LAYLM (配列番号4)

、を有する候補ペプチドを用いて、Expressed Sequence Tag database (Nat. Center for Biol. Information. www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST) を検索した。この検索では、デフォルトパラメータ中の遺伝子コード縮重性を可能にする反復 (iteration) で候補ペプチドの逆翻訳を可能にするアルゴリズム (tblastn) を使用した。この検索結果は、EST AA915932、ならびにAA926744、AA527292、AI215158およびAA356476を、MAP-キナーゼホスファターゼ候補として同定した。このESTは、発現された遺伝子 (例えば、MAP-キナーゼホスファターゼ活性を有するDSP-2をコードする遺伝子) の完全なコード領域を含まない。また、センス鎖およびオープンリーディングフレームも同定されなかった。

【0092】

全長コード配列を得るため、供給業者の指示に従って、5' / 3' RACEキ

ット(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)を用いて、記載のように(Frohmanら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:8998、1998; Oharaら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:5673、1989; Lohら、Science 243:217、1989)、5'および3' RACE (rapid amplification of cDNA end: cDNA末端の迅速増幅)で、ヒト胸腺cDNAをスクリーニングした。活性部位ドメインにすぐ隣接する配列情報を、ヒト胸腺cDNAでの5' and 3' RACE反応において、用いた。これには、以下のプライマー(配列番号5~9)：

【0093】

【化1】

DSP2-SP1: 5'--CCA CTG GGG AAC TGA CCA TGT--3' SEQ ID NO:5
 DSP2-SP2: 5'—GTA GGC GAG GCA CAG GGC AG—3' SEQ ID NO:6
 DSP2-SP3: 5'—CCT GCT TCA TCT CCA CGC TG—3' SEQ ID NO:7
 DSP2-SP5 5'—CCT GTG GCT GAC TCC CCT AAC TC—3' SEQ ID NO:8
 DSP2-SP6: 5'—CAG CGT GGA GAT GAA GCA GG—3' SEQ ID NO:9

を用いた。

【0094】

188アミノ酸のタンパク質(図2:配列番号2)をコードするcDNA(図1:配列番号1)をDSP-2として同定した。この配列は、他のMAP-キナーゼホスファターゼ(図3)と有意な相同性を有した。同定されたcDNAは、564塩基対のコード領域、ならびに関連する5'および3'非翻訳配列を含む。DSP-2についての活性部位ドメインを、配列番号1の102位で開始するヌクレオチドによりコードされる領域に局在化させた。

【0095】

半定量的RT-PCR分析を実行した。これらの分析は、免疫系の組織における、有意により高いレベルのDSP-2 mRNAを示した。

【0096】

(実施例2)

(ヒト組織におけるDSP-2発現)

本実施例において、DSP-2コード核酸配列が、種々の組織供給源由来のヒトポリA+RNAにハイブリダイズすることを示す。核酸ハイブリダイゼーションプローブとしての使用のため、全長DSP-2コードcDNA(配列番号1)を、Ausubelら(1998 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA)に記載のランダムプライマー方法により³²P標識した。このプローブを、検出可能なアクチンmRNAの量に基準化した、複数のヒト組織に由来するヒトポリA+RNAを含むプロットにハイブリダイズした(図4、カタログ番号7759-1; Clontech, Inc., Palo Alto, CA)。Express Hyb™溶液(Clontech)中で68℃で30分間、プロットをプレハイブリダイゼーションし、次いで、標識したプローブを用い、Express Hyb™溶液中で、68℃で1時間ハイブリダイズした。次に、このプロットを、2×SSC、0.5% SDS中で、室温にて40分間洗浄し、次いで、0.1×SSC、0.1% SDS中で50℃で40分間、第2の洗浄をした。プロットを風乾し、次いで、Hyperfilm MP™オートラジオグラフィフィルム(Amersham Life Science, Arlington Hts, IL)に一晩曝露した。結果を図4に示す。ここでは、RNAのヒト組織供給源は以下のとおりであった: レーン1、脾臓; レーン2、胸腺; レーン3、前立腺; レーン4、精巣; レーン5、卵巣; レーン6、小腸; レーン7、結腸; レーン8、末梢血白血球。ヒト精巣において、特に言明されたDSP-2発現が、検出された。

【0097】

前述により、本発明の特定の実施形態が例示の目的で本明細書において記載されるが、種々の改変が本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。従って、本発明は添付の特許請求の範囲によってしか限定されない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、DSP-2についてのcDNA配列(配列番号1)を示し、翻訳領域が太字で示される。開始コドンおよび終止コドンは、四角で囲んで示される。

【図2】

図2は、DSP-2の推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図3】

図3は、DSP-2と他のMAP-キナーゼホスファターゼとの間の配列類似性を示す、配列アラインメントである。

【図4】

図4は、³²P標識した全長DSP-2コード核酸配列をプローブとして使用する、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを示す。プロットは、以下のような種々の組織型由来のヒトポリA+RNAを含んだ：レーン1、脾臓；レーン2、胸腺；レーン3、前立腺；レーン4、精巣；レーン5、卵巣；レーン6、小腸；レーン7、結腸；レーン8、末梢血白血球。

【図1】

DSP-2 (564塩基対にコードされる)

```

1  CTTTTCTGT  ATTTTTTGC  TTCATTCTG  GTGTTTCGT  GACTGCTGAC  CACTGACCCA
61  CCGCCTTGAT  GACAGCACCC  TCGTGTGCT  TCCCAGTCA  GTTCCGGCAG  CCCTCAGTCA
121 GCGGCCTCTC  GCAGATAACC  AAAAGCCTGT  ATATCAGCA  TGGTGTGGCC  GCCAACACA
181 AGTCATGCT  GTCTAGCAAC  CAGATCACCA  TGGTCATCA  TGTCTCAGTG  GAGGTAGTGA
241 ACACCTTGTA  TGAGGATATC  CAGTACATGC  AGGTACCTGT  GGCCTGACTCC  CCTAACTCAC
301 GTCTCTGTA  CTTCTTTGAC  CCTATTGCTG  ACCATATCCA  CAGCGTGGAG  ATGAAGCAGG
361 GCCGTACTTT  GCTGCACTGT  GCTGCTGGTG  TGAGCCGCTC  AGCTGCCCTG  TGCCTCGCCT
421 ACCTCATGAA  GTACCACGCC  ATGTCCCTGC  TGGACGCCA  CACGTGGACC  AAGTCATGCC
481 GGGCCATCAT  CCGACCCAAC  AGCGGCTTTT  GGGAGCAGCT  CATCCACTAT  GAGTTCCAAT
541 TGTTTGGCAA  GAACACTGTG  CACATGGTCA  GTTCCCCAGT  GGGAATGATC  CCTGACATCT
601 ATGAGAAGGA  AGTCCGTTTG  ATGATPCCAC  TGTGAGCCAT  CCCACGAGCC  CCTGCATTTG
661 AGTCAGAGGT  ACAGATCTAT  TGTGTACTTT  ACACCAAGAT  CCAAACTTGA  ACATTCTACT
721 TTTGTTGATA  CAGAAAAAAA  CAGATGATGC  CTTTATGAG  CACAAAAAAG  AGTTGCTGTA
781 GCTTTAACT  TTATAATCCA  TTTTTTTTCA  GATTAAACTA  ATTGTGAGAT  GGTG

```

【図2】

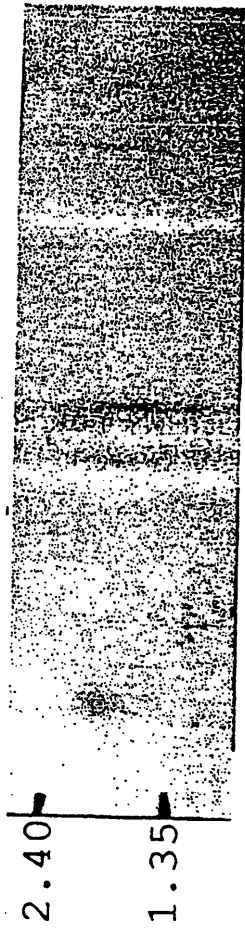
翻訳した (883アミノ酸)

```

MTAPSCAFFVQFRQPSVSGLSQITKSLYISNGVAANNKMLMLSSNQITMVINVSVEVVNLYEDIQY
MQVPVADSPNSRLCDFDPIADHIESVEMKQGRILLHCAAQGVSRSAALCLAYLMKYHAMSL LDA
HTWTKSCRPIRPNNSGFWEQLIHVEFQLFGKNTVHMVSSPVGMIPDIYEKEVRLMPL

```


【图4】



Sp Th Pr Te Ov SI Co PB

脾臟
胸腺
前立腺
精巢
卵巢
小腸
結腸
末梢血

● SP =
● Th =
● Pr =
● Te =
● Ov =
● SI =
● Co =
● PB =

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/07589
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/55 C12Q1/42	C12N9/16 C07K15/40
	C12N15/11	G01N33/53
		C12Q1/68
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 C07K G01N C12Q		
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, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ, MEDLINE, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession AF038844, 6 January 1999 (1999-01-06) YUAN Y ET AL: "Homo sapiens MKP-1 like protein tyrosine phosphatase mRNA, complete cds" XP002145743 61% identity in 571 BP overlap with SEQ ID NO 1 and 50.3% identity in 179 AA overlap between the translated sequence and SEQ ID NO 2 --- -/-	1-14
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *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 *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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 August 2000		11/09/2000
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) 340-3018		Authorized officer Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession AA527292, 22 July 1997 (1997-07-22) NCI-CGAP: "ng39q09.s1 NCI_CGAP_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:937216 3' similar to W:F13D11.3 CE04389 PROTEIN TYROSINE-PHOSPHATASE FAMILY ;, mRNA sequence." XP002145744 cited in the application 99.1% identity in 562 BP overlap with SEQ ID NO 1</p>	1-14
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Accession AA915932, 16 April 1998 (1998-04-16) NCI-CGAP: "on18c06.s1 NCI_CGAP_Lu5 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1557034 3' similar to TR:Q91790 Q91790 MAP KINASE PHOSPHATASE ;, mRNA sequence." XP002145745 cited in the application 99.5% identity in 546 BP overlap with SEQ ID NO 1</p>	1-14
P,X	<p>WO 99 41284 A (GENETICS INST) 19 August 1999 (1999-08-19) page 25 -page 26 50.3% identity in 179 AA overlap between SEQ ID 10 of W09941284 and SEQ ID NO 2 60.5% identity in 569 BP overlap between SEQ ID 9 of W09941284 and SEQ ID NO 1</p>	1-14
P,X	<p>WO 99 49037 A (INCYTE PHARMA INC ;BAUGHN MARIAH (US); CORLEY NEIL C (US); YUE HEN) 30 September 1999 (1999-09-30) page 17 -page 18 50.3% identity in 179 AA overlap between SEQ ID NO 5 of W09949037 and SEQ ID NO 2 61% identity in 571 BP overlap between SEQ ID NO 6 of W09949037 and SEQ ID NO 1</p>	1-14, 46, 47
A	<p>MUDA MARCO ET AL: "Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 8, 1997, pages 5141-5151, XP002144712 ISSN: 0021-9258 abstract figure 1 figure 3B</p>	1-14

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No. PCT/US 00/07589
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FLINT A J ET AL: "DEVELOPMENT OF SUBSTRATE-TRAPPING MUTANTS TO IDENTIFY PHYSIOLOGICAL SUBSTRATES OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 94, 1 March 1997 (1997-03-01), pages 1680-1685, XPO02051429 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	46,47
A	<p>KEYSE S M: "AN EMERGING FAMILY OF DUAL SPECIFICITY MAP KINASE PHOSPHATASES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 1265, 1995, pages 152-160, XP000196716 ISSN: 0167-4889 abstract figure 1</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/07589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9941284 A	19-08-1999	AU 2669899 A	30-08-1999
WO 9949037 A	30-09-1999	AU 3002199 A	18-10-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 37/00		A 6 1 P 37/06	4 B 0 6 5
37/06		43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
43/00	1 1 1	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		9/16	B
5/10		C 1 2 Q 1/02	
9/16		1/68	A
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
1/68		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50			M
33/53		33/566	
33/566		A 6 1 K 48/00	
// A 6 1 K 38/46		C 1 2 P 21/08	
48/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 P 21/08		5/00	A
		A 6 1 K 37/54	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36
FB01 FB02 FB03 FB06 FB07
4B024 AA01 AA11 BA11 CA04 CA09
CA12 HA14
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03
4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ27 QQ33
QQ43 QR07 QR13 QR32 QR55
QR62 QR77 QS25 QS34 QX02
4B064 AG27 CA20 DA05 DA14
4B065 AA90Y AB01 CA31 CA44
CA46
4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA13
AA16 BA01 BA08 BA22 CA18
DC22 MA17 MA22 MA23 MA34
MA52 MA55 MA56 MA59 MA60
MA66 NA14 ZB07 ZB08 ZB13
ZB26 ZC19 ZC20 ZC21
4C085 AA14 BB22 CC23 EE01
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA75
DA89 EA20 EA51 FA74 GA26

专利名称(译)	DSP-2双特异性MAP激酶磷酸酶		
公开(公告)号	JP2002539792A	公开(公告)日	2002-11-26
申请号	JP2000606758	申请日	2000-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	脓毒症直到公司		
申请(专利权)人(译)	Seputiru公司		
[标]发明人	ルーケラルフエム ウェイボ		
发明人	ルーケ, ラルフ エム. ウェイ, ボ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/46 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/22 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/55 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P3/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C12N9/16 C12Y301/03016 C12Y301/03048		
FI分类号	A61K39/395.P A61K45/00 A61P3/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/16.B C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K48/00 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/54		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ08 4B063/QQ27 4B063/QQ33 4B063/QQ43 4B063/QR07 4B063/QR13 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/DC22 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA34 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB13 4C084/ZB26 4C084/ZC19 4C084/ZC20 4C084/ZC21 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/125957 1999-03-24 US 09/527376 2000-03-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供本发明的组合物和方法用于治疗涉及细胞增殖，细胞分化和细胞存活的病症。特别地，提供了刺激DSP-2底物的去磷酸化的双特异性磷酸酶DSP-2和DSP-2的多肽变体。DSP-2多肽可用于例如鉴定抑制DSP-2活性的抗体和其他试剂。DSP-2多肽和试剂可用于调节细胞增殖，细胞分化和细胞存活。

