

(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2003 - 517836

(P2003 - 517836A)

(43)公表日 平成15年6月3日(2003.6.3)

(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 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 3/00	4 B 0 5 0
A 6 1 P 3/00		3/10	4 B 0 6 3
3/10		9/00	4 B 0 6 5
9/00		9/02	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全212数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 546892(P2001 - 546892)

(86)(22)出願日 平成12年12月21日(2000.12.21)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月20日(2002.6.20)

(86)国際出願番号 PCT/US00/34736

(87)国際公開番号 W001/046394

(87)国際公開日 平成13年6月28日(2001.6.28)

(31)優先権主張番号 60/173,255

(32)優先日 平成11年12月21日(1999.12.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/175,766

(32)優先日 平成11年12月28日(1999.12.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 スーージェン・インコーポレーテッド
SUGEN, INC.
アメリカ合衆国カリフォルニア州94080, サ
ウス・サンフランシスコ, イースト・グラン
ド・アベニュー230

(72)発明者 ブラウマン, グレゴリー・ディー
アメリカ合衆国 94070 カリフォルニア州
サン カルロス, ワインディング ウェイ
35

(74)代理人 弁理士 田中 玲子 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 哺乳動物蛋白質ホスファターゼ

(57)【要約】

本発明は、ホスファターゼポリペプチド、ホスファターゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ならびに種々のホスファターゼ関連疾病および状態の診断および治療に有用な種々の産物および方法に関する。バイオインフォマティクス戦略を用いることにより、MAPキナーゼホスファターゼPTPおよびSTPの哺乳動物メンバーが同定され、その蛋白質構造が推定された。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ホスファターゼポリペプチドをコードする，単離された，濃縮された，または精製された核酸分子であって，前記核酸分子は，

(a) 配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；

(b) (a)のヌクレオチド配列の相補体である；

(c) ストリンジェントな条件下で(a)のヌクレオチド分子にハイブリダイズし，かつ天然に生ずるホスファターゼポリペプチドをコードする；

(d) 配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするが，ただし，前記ポリペプチドは，N末端ドメイン，C末端触媒ドメイン，触媒ドメイン，C末端ドメイン，コイルドコイル構造領域，プロリンリッチ領域，スペーサー領域およびC末端テールの全部ではないが1またはそれ以上を欠失しており；または

(e) (d)のヌクレオチド配列の相補体である，

のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする核酸分子。

【請求項2】 宿主細胞において転写を開始させるのに有効なベクターまたはプロモーターをさらに含む，請求項1記載の核酸分子。

【請求項3】 前記核酸分子が，哺乳動物から単離された，濃縮された，または精製されたものである，請求項1記載の核酸分子。

【請求項4】 前記哺乳動物がヒトである，請求項3記載の核酸分子。

【請求項5】 試料中のホスファターゼポリペプチドをコードする核酸の検出に用いられ，前記ホスファターゼポリペプチドは，配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する

ホスファターゼポリペプチドからなる群より選択される，請求項1記載の核酸ブロープ。

【請求項6】 配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドをコードする請求項1記載の核酸分子を含む組換え細胞。

【請求項7】 単離された，濃縮された，または精製されたホスファターゼポリペプチドであって，

(a) 配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列；または

(b) 配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって，ただし，ポリペプチドは，N末端ドメイン，C末端触媒ドメイン，触媒ドメイン，C末端ドメイン，コイルドコイル構造領域，プロリンリッチ領域，スペーサー領域，およびC末端テールからなる群より選択されるドメインの全部ではないが1またはそれ以上を欠失している，を有するアミノ酸配列を含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項8】 前記ポリペプチドが，哺乳動物から単離され，精製され，または濃縮されたものである，請求項7記載のホスファターゼポリペプチド。

【請求項9】 前記哺乳動物がヒトである，請求項8記載のホスファターゼポリペプチド。

【請求項10】 ホスファターゼポリペプチドまたは前記ポリペプチドのドメインに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントであって，前記ポリペプチドは，配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号2

1, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドであることを特徴とする抗体または抗体フラグメント。

【請求項11】 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項12】 請求項7または8記載のポリペプチドに結合する抗体および負対照抗体を含むキット。

【請求項13】 ホスファターゼポリペプチドの活性を調節する物質を同定する方法であって,

(a) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドを試験物質と接触させ;

(b) 前記ポリペプチドの活性を測定し;そして

(c) 前記物質が前記ポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する,

の各工程を含む方法。

【請求項14】 細胞においてホスファターゼポリペプチドの活性を調節する物質を同定する方法であって,

(a) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドを発現させ;

(b) 前記細胞に試験物質を加え;そして

(c) 細胞表現型または前記ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化をモニターする,

の各工程を含む方法。

【請求項15】 治療を必要とする患者に、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼの活性を調節する物質を投与することにより疾病または疾患を治療する方法。

【請求項16】 前記疾病または疾患が、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳または神経関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される、請求項15記載の方法。

【請求項17】 前記疾病または疾患が、組織の癌；造血性起源の癌；中枢神経系の疾病；末梢神経系の疾病；アルツハイマー病；パーキンソン病；多発性硬化症；筋萎縮性側索硬化症；ウイルス感染；プリオンにより引き起こされる感染；細菌により引き起こされる感染；真菌により引き起こされる感染；眼性疾病，代謝性疾患，および糖尿病からなる群より選択される，請求項15記載の方法。

【請求項18】 前記疾病または疾患が、片頭痛；痛み；性的機能不全；気分障害；注意障害；認識障害；低血圧；高血圧；精神病性疾患；神経学的疾患；運動異常症；代謝性疾患；および臓器移植拒絶からなる群より選択される，請求項15記載の方法。

【請求項19】 前記物質がインビトロでホスファターゼ活性を調節する，請求項15記載の方法。

【請求項20】 前記物質がホスファターゼ阻害剤である，請求項19記載の方法。

【請求項21】 疾病または疾患の診断道具として試料中においてホスファターゼポリペプチドを検出する方法であって，
(a) 前記試料を，ハイブリダイゼーションアッセイ条件下で配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および

配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドの核酸標的領域とハイブリダイズする核酸プローブと接触させ、前記プローブは、前記ポリペプチド、そのフラグメント、または前記配列およびフラグメントの相補体をコードする核酸配列を含み；そして

(b) プローブ：標的領域ハイブリッドの存在または量を前記疾病の指標として検出する、

の各工程を含む方法。

【請求項22】 前記疾病または疾患が、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳または神経関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項23】 前記疾病または疾患が、組織の癌；造血性起源の癌；中枢神経系の疾病；末梢神経系の疾病；アルツハイマー病；パーキンソン病；多発性硬化症；筋萎縮性側索硬化症；ウイルス感染；プリオンにより引き起こされる感染；細菌により引き起こされる感染；真菌により引き起こされる感染；および眼性疾患からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項24】 前記疾病または疾患が、片頭痛、痛み；性的機能不全；気分障害；注意障害；認識障害；低血圧；高血圧；精神病性疾患；神経学的疾患；運動異常症；代謝性疾患；および臓器移植拒絶からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項25】 疾病または疾患の診断道具として試料中のホスファターゼポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 試料中の、前記ホスファターゼポリペプチドをコードする核酸標的領域を、前記ホスファターゼポリペプチドまたはその1またはそれ以上のフラグメントをコードする対照核酸標的領域と比較し、ここで、前記ホスファターゼポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24、に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列またはその1またはそれ以上のフラグメントを有し

ており；そして

(b) 前記標的領域と前記対照標的領域との間の配列または量の差異を前記疾病または疾患の指標として検出する，
の各工程を含む方法。

【請求項26】 前記疾病または疾患が，癌，免疫関連疾病および疾患，心臓血管疾病，脳または神経関連疾病，および代謝性疾患からなる群より選択される，請求項25記載の方法。

【請求項27】 前記疾病または疾患が，組織の癌；造血性起源の癌；中枢神経系の疾病；末梢神経系の疾病；アルツハイマー病；パーキンソン病；多発性硬化症；筋萎縮性側索硬化症；ウイルス感染；プリオンにより引き起こされる感染；細菌により引き起こされる感染；真菌により引き起こされる感染；および眼性疾病からなる群より選択される，請求項25記載の方法。

【請求項28】 前記疾病または疾患が，片頭痛，痛み；性的機能不全；気分障害；注意障害；認識障害；低血圧；高血圧；精神病性疾患；神経学的疾患；運動異常症；代謝性疾患；および臓器移植拒絶からなる群より選択される，請求項25記載の方法。

【請求項29】 配列番号1，配列番号2，配列番号3，配列番号4，配列番号5，配列番号6，配列番号7，配列番号8，配列番号9，配列番号10，配列番号11，および配列番号12からなる群より選択される，哺乳動物ホスファターゼまたはそのフラグメントをコードする核酸。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、米国特許仮出願60/173,255,60/178,078,60/179,301,60/175,766,(およびSugenの書類番号"Cel_16"で表される仮出願)に基づく優先権を主張する。これらの出願はすべてその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0002】**発明の分野**

本発明は、ホスファターゼポリペプチド、ホスファターゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ならびに種々のホスファターゼ関連疾病および状態の診断および治療に有用な種々の産物および方法に関する。

【0003】**発明の背景**

以下の発明の背景の記載は本発明の理解を助けるために提供され、本発明に対する先行技術であるかまたはそれを記述すると認めるものではない。

【0004】

細胞シグナル伝達は、各種の細胞プロセスを制御する外部刺激を細胞内部にリレーするための基本的メカニズムである。シグナル伝達の重要な生物化学メカニズムの一つは蛋白質キナーゼによる蛋白質の可逆的リン酸化であり、これは、成熟蛋白質の構造と機能を変化させることによりその活性を制御することができる。真核生物で最も良く特性決定されている蛋白質キナーゼは、セリン、トレオニンおよびチロシン残基のアルコール部分で蛋白質をリン酸化する。これらのキナーゼは、セリンおよびトレオニンのリン酸化に特異的なものと、チロシンのリン酸化に特異的なものの2グループに大別される。

【0005】

所定の基質のリン酸化状態はまた、蛋白質ホスファターゼ、すなわち、蛋白質キナーゼにより所定の基質に加えられたリン酸基の除去を担う一群の蛋白質によっても制御される。蛋白質ホスファターゼもまた、セリン/トレオニン、またはチロシンのいずれかに特異的であるとして分類することができる。このファミリ

一のいくつかのメンバーは、チロシンのみを脱リン酸化することができ、"蛋白質チロシンホスファターゼ" ("PTP")として知られており、他のものはチロシンならびにセリンおよびトレオニンを脱リン酸化することができ、"二重特異性ホスファターゼ" ("DSP")と称され；第3のファミリーはセリンまたはトレオニンのみをリン酸化する("STP")。これらは、Fauman et al. (Trends Biochem. Sci. 1996 Nov 21(11): 413-7)およびMartell et al. (Mol. Cells. 1998 Feb 28; 8(1): 2-11)に記載される。これらの蛋白質は、共通の触媒コア構造を含む250-300アミノ酸ドメインを共有する。関連するホスファターゼは、チロシンホスファターゼ、二重特異性ホスファターゼ、およびミオチューブラリン様(myotubularin-like)ホスファターゼ((Fauman et al., ;およびMartell et al., , 上掲)の別個のサブファミリーに分類される。

【0006】

ホスファターゼは、上流のレギュレータと相互作用すると考えられている種々の非触媒ドメインを有する。例としては、SH3含有蛋白質との相互作用のためのプロリンリッチドメイン、またはRac, Rho, およびRab等の小さいG蛋白質との相互作用のための特異的ドメインが含まれる。これらの相互作用は、種々の細胞表面レセプターの活性化等の外部刺激、例えば、チロシンキナーゼ、サイトカインレセプター、TNFレセプター、Fas, T細胞レセプター、CD28, またはCD40に応答した独特の生化学的経路の間をクロストークするためのメカニズムを提供するかもしれない。

【0007】

ホスファターゼは、種々の細胞応答、例えば、成長因子、サイトカインおよびホルモンに対する応答、酸化-, UV-, または照射- 関連ストレス経路、炎症性シグナル(例えばTNF), アポトーシス刺激(例えばFas), TおよびB細胞共刺激、細胞骨格構造の制御、および細胞トランスフォーメーション等の制御において関与することが示唆されている(THE PROTEIN PHOSPHATASE FACTBOOK, Tonks et al., Acade

mic Press, 2000を参照)。

【0008】

したがって、その不適切な活性が癌または他の疾患につながりうる追加のホスファターゼを同定し、これらの疾患の適切な治療をも同定することが必要とされている。

【0009】

発明の概要

本発明にしたがうホスファターゼの特徴を記載するために、以下の略号を用いる：

D s P T P 二重特異性蛋白質ホスファターゼ

D U S 二重特異性ホスファターゼ

M K P M A Pキナーゼホスファターゼ

M T M 筋細管ミオパシー(ミオチューブラリン)ホスファターゼ

P T P 蛋白質チロシンホスファターゼ

P T E N ホスファターゼおよびテンシンホモログ

【0010】

"モチーフ抽出"バイオインフォマティクスのスクリプトを使用することにより、我々は、ホスファターゼファミリーのある種の追加の哺乳動物メンバーを同定し、これは本明細書に記載される。本発明は、12個のホスファターゼの部分配列または完全配列、ならびにこれらの分類、予測されたまたは推定された蛋白質構造、およびこれらの蛋白質の生物学的および治療上の関連性を解明する戦略を提供する。これらの新規蛋白質には、以下のものが含まれる：8つのM A Pキナーゼホスファターゼ酵素("M K P")、これはD S Pファミリーのメンバーである；S T Pファミリーからの2つのホスファターゼ；およびP T Pファミリーからの2つのホスファターゼ。新規な蛋白質を確立されたファミリーに属するとして分類することは、各蛋白質の残りの非触媒部分に存在するモチーフの推定におけるのみならず、これらの蛋白質の制御、基質、およびシグナリング経路においても、非常に正確であることが証明された。

【0011】

本発明の1つの観点は、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドをコードする、単離された、濃縮された、または精製された核酸分子を特徴とする。

【0012】

核酸に関して"単離された"とは、互いに結合した10個（好ましくは21個、より好ましくは39個、最も好ましくは75個）またはそれ以上のヌクレオチドのポリマーを意味し、天然起源から単離された、またはセンス鎖または相補的なアンチセンス鎖として合成されるDNAおよびRNAが含まれる。本発明のある態様においては、より長い核酸が好ましく、例えば、300、600、900、1200、1500、またはそれ以上のヌクレオチドのもの、および/または配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12に記載される配列からなる群より選択される配列と、少なくとも50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%または99%の同一性を有するものが好ましい。

【0013】

本発明の単離された核酸は、これが自然には純粋なまたは分離された状態で見いだされないという点において独特である。"単離された"との用語の使用は、天然に生ずる配列がその通常の細胞環境（すなわち染色体）から除かれていることを表す。すなわち、配列は、無細胞溶液中にあってもよく、または異なる細胞環境に置かれていてもよい。この用語は、この配列が存在する唯一のヌクレオチド鎖であることを意味するものではなく、天然にこれに付随する非ヌクレオチド物質を本質的に含まず（少なくとも約90-95%純粋）、したがって、単離された染色体とは区別されることを意味する。

【0014】

核酸に関連して、"濃縮された"との用語の使用は、特定のDNAまたはRNA

配列が、目的とする細胞または溶液中に存在する総DNAまたはRNA中で、正常または疾病細胞、またはこの配列が由来する細胞におけるより有意に高い割合（2 - 5倍）を占めることを意味する。これは、存在する他のDNAまたはRNAの量の優先的減少、または特定のDNAまたはRNA配列の量の優先的増加、またはこれらの2つの組み合わせにより、人が生じさせることができる。しかし、濃縮されたとは、他のDNAまたはRNA配列が存在しないことを意味するものではなく、単に、目的とする配列の相対的な量が有意に増加されていることを意味することに注意すべきである。"有意に"との用語は、増加のレベルがそのような増加を作成した人にとって有用であることを示すために用いられ、一般に、他の核酸に比べて少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも5 - 10倍、またはそれ以上増加していることを意味する。またこの用語は、他の起源からのDNAまたはRNAが存在しないことを意味するものではない。他の起源のDNAは、例えば、酵母または細菌ゲノム、またはクローニングベクター、例えばpUC19からのDNAでありうる。この用語は、1つのmRNAのレベルが他の種のmRNAと比較して自然に増加している天然に生ずる事象、例えばウイルス感染または腫瘍タイプの成長から区別される。すなわち、この用語は、人が所望の核酸の比率を上昇させることを意図する状況のみをカバーする。

【0015】

ある目的のためには、ヌクレオチド配列が精製された形であることも有利である。核酸に関して、"精製された"との用語は、絶対的純度（例えば均一な調製物）を要求するものではない。むしろ、これは配列が天然の環境におけるより比較的純粋であることを示す（天然のレベルと比較して、このレベルは、例えばmg/mLで少なくとも2 - 5倍高い）。cDNAライブラリから単離された個々のクローンは、電気泳動的に均一にまで精製することができる。これらのクローンから得られた本発明のDNA分子は、総DNAからまたは総RNAから直接得ることができる。cDNAクローンは天然に生じず、好ましくは部分的に精製した天然に生ずる物質（メッセンジャーRNA）の操作により得る。mRNAからのcDNAライブラリの構築は、合成物質（cDNA）の作成を含み、純粋な個々のcDNAクローンは、cDNAライブラリを有する細胞のクローン選択により

合成ライブラリから単離することができる。すなわち、mRNAからcDNAライブラリを構築し、個々のcDNAクローンを単離することを含む工程により、天然のメッセンジャーのおよそ10⁶倍の精製が得られる。すなわち、少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁の精製が明示的に企図される。

【0016】

"ホスファターゼポリペプチド"とは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド中の、32個（好ましくは40、より好ましくは45、最も好ましくは55個）またはそれ以上の連続するアミノ酸を意味する。ある観点においては、100、200、300、400、450、500、550、600、700、800、900個またはそれ以上のアミノ酸のポリペプチドが好ましい。ホスファターゼポリペプチドは、ポリペプチドの機能的活性が保持される限り、全長核酸配列または全長核酸配列の任意の部分（例えば、本明細書において定義される"フラグメント"）、例えば、触媒ドメイン（本明細書において定義される）またはその一部によりコードされることができる。遺伝コードの縮重のため、多数の異なる核酸配列が同じアミノ酸配列をコードしうることは当該技術分野においてよく知られている。同じく、アミノ酸の保存的変更を行って、元の機能を保持している蛋白質またはポリペプチドを得ることができることも、当該技術分野においてよく知られている。そのような置換には、アミノ酸を類似の物理化学的特性を有する残基で置き換えること、例えば、1つの脂肪族残基（Ile、Val、LeuまたはAla）を別のもので、または塩基性残基LysおよびArg、酸性残基GluおよびAsp、アミド残基GlnおよびAsn、ヒドロキシル残基SerおよびTyr、または芳香族残基PheおよびTyrの間で置き換えることが含まれる。蛋白質全体にあつたとしてもわずかの影響しか与えないアミノ酸の交換を作成することに関するさらなる情報は、Bowie et al., Science, 1990, 247, 1306-1310に見いだすことができる（図面

および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)。すべての場合において、すべての順列がこの開示によりカバーされることが意図される。

【0017】

本発明のホスファターゼペプチドのアミノ酸配列は、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列、または対応する全長アミノ酸配列、またはそのフラグメントを有する配列に実質的に類似するであろう。

【0018】

配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載される配列からなる群より選択される配列と実質的に類似する配列は、好ましくは配列と少なくとも90%の同一性（より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは99-100%）を有するであろう。

【0019】

"同一性"とは、その類似性または関係の尺度である配列の性質を意味する。同一性は、同一である残基の数を、既知の配列または既知の配列のドメイン中の残基の総数で割り、100を乗ずることにより測定する。"ギャップ"とは、アミノ酸の付加または欠失により生じたアラインメント中の空間である。すなわち、完全に同一の配列の2つのコピーは100%の同一性を有するが、より低い程度に保存され、欠失、付加または置換を含む配列はより低い程度の同一性を有するであろう。当業者は、標準的なパラメータを用いて配列の同一性を決定するためのいくつかのコンピュータプログラム、例えば、Gapped BLASTまたはPSI-BLAST(Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402), BLAST(Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), およびスミス-ウォーターマン(Smith-Waterman)

(Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197) が利用可能であることを認識するであろう。好ましくは、これらのプログラムのデフォルト設定を用いるが、当業者は、これらの設定を変更することが必要であるか否かを認識しており、どのようにして変更するかがわかる。

【0020】

"類似性"は、同一の残基の数と保存的に置換された残基の数 (Bowie, et al. Science, 1999, 247, 1306-1310を参照(図面および表を含め、その全体を本明細書の一部としてここに引用する)との合計を残基とギャップの総数で割り、100を乗ずることにより測定することができる。

【0021】

好ましい態様においては、本発明は、以下のヌクレオチド配列を含むホスファターゼポリペプチドをコードする、単離された、濃縮されたまたは精製された核酸分子を特徴とする：

(a) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；

(b) (a)のヌクレオチド配列の相補体である；

(c) (a)のヌクレオチド分子に高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ天然に生ずるホスファターゼポリペプチドをコードする；

(d) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、ただしN末端ドメイン, 触媒ドメイン, C末端触媒ドメイン, C末端ドメイン, コイルドコイル構造領域, プロリンリッチ領域, スペーサー領域, およびC末端テールからなる群より選択されるドメインの全部ではないが1またはそれ以上を欠失しているアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする；および

(e)(d)のヌクレオチド配列の相補体である。

【0022】

"相補体"との用語は、互いに多くの望ましい相互作用を形成しうる2つのヌクレオチドを表す。例えば、アデニンはチミンと2つの水素結合を形成することができるため、チミンに相補的である。同様に、グアニンとシトシンは3つの水素結合を形成することができるため、相補的である。あるヌクレオチド配列は、第1の配列のすべてのヌクレオチドが第2の配列のすべてのヌクレオチドと相補的である場合、他のヌクレオチド配列の相補体である。

【0023】

所望の特異性および選択性に応じて、種々の低いまたは高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を用いることができる。これらの条件は、当業者にはよく知られている。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下では、高度に相補的な核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは、そのような条件は、20個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止し、より好ましくは、そのような条件は、50個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止し、最も好ましくは、そのような条件は、100個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。場合によっては、この条件は、全長配列中に5個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。

【0024】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件とは、少なくとも以下の程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件を意味する： 50% ホルムアミド、 $5\times SSC$ 、 $50\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{pH } 6.8$ 、 0.5% SDS、 0.1 mg/mL 超音波処理サケ精子DNA、および $5\times$ デンハルト溶液中で 42°C で一夜のハイブリダイゼーション； $2\times SSC$ 、 0.1% SDSで 45°C での洗浄；および $0.2\times SSC$ 、 0.1% SDSで 45°C での洗浄。いくつかの最もストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件においては、2回目の洗浄は、 $0.1\times SSC$ で 70°C までの温度で行うことがで

きる (Berger et al (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, pg 421 (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)。しかし、他の用途は、これらの条件の組の間に入る条件の使用を必要とするかもしれない。所望のハイブリダイゼーションを達成するのに必要な条件を決定する方法は当業者にはよく知られており、いくつかの因子、例えば、限定されないが、ハイブリダイズすべき配列および試験すべき試料に基づく。低いストリンジェンシーの洗浄条件は、しばしば洗浄工程の間により低い温度、例えば、65、60、55、50、または42を用いる。

【0025】

"ドメイン"との用語は、特定の機能を含むポリペプチドの領域を表す。例えば、シグナル伝達蛋白質のN末端またはC末端ドメインは、例えば、限定されないが、シグナル伝達分子を細胞の異なる領域に局在させる分子に結合し、特定の細胞シグナルを伝播するのに直接関与する他のシグナリング分子に結合する、等の機能を提供することができる。あるドメインは蛋白質の残部と別々に発現させてそれ自身で機能することができるが、他のドメインはその機能を保持するためには無傷の蛋白質の一部のままでなければならない。後者は蛋白質の機能的領域とも称され、これもまたドメインと関連する。

【0026】

"N末端ドメイン"との用語は、蛋白質ホスファターゼの開始メチオニンと触媒的ドメインとの間に位置する触媒外領域を表す。N末端ドメインは、蛋白質配列を非重複蛋白質データベースに対してスミス-ウォーターマンアラインメントを行い、触媒的ドメインのN末端境界を規定することにより同定することができる。N末端ドメインは、その長さに応じて、ホスファターゼ機能において制御的役割を果たすかまたは果たさない。"触媒ドメイン"とは、典型的には25-300アミノ酸の長さであり、高エネルギーリン酸ドナー分子、例えばATPまたはGTPから、それ自身(自己リン酸化)または他の蛋白質(外因性リン酸化)へのリン酸転移反応を担う蛋白質ホスファターゼの領域を表す。蛋白質ホスファターゼの触媒ドメインは高度に保存されたアミノ酸残基を含む12個のサブドメイン

から構成され、正しいポリペプチドのフォールディングおよび触媒を担う。触媒ドメインは、蛋白質配列を非重複蛋白質データベースに対してをスミス・ウォーターマンアライメントさせた後に同定することができる。

【0027】

本明細書において用いられる場合、"触媒活性"との用語は、ホスファターゼ触媒ドメインが基質をリン酸化する速度を規定する。触媒活性は、例えば、リン酸化された生成物に変換される基質の量を時間の関数として決定することにより測定することができる。触媒活性は、時間を一定にして定められた時間の後にリン酸化された基質の濃度を決定することにより、本発明の方法により測定することができる。基質のリン酸化は、蛋白質ホスファターゼの活性部位において生ずる。活性部位は、通常は、基質が蛋白質ホスファターゼに結合し、リン酸化される空洞である。

【0028】

本明細書において用いられる場合、"基質"との用語は、本発明のホスファターゼによりリン酸化される分子を表す。ホスファターゼは、セリン/トレオニンまたはチロシンアミノ酸で基質をリン酸化する。分子は別の蛋白質またはポリペプチドであってもよい。

【0029】

"C末端ドメイン"との用語は、蛋白質ホスファターゼの触媒ドメインまたは最後の（C末端に最も近い位置の）機能的ドメインとカルボキシ末端アミノ酸残基との間に位置する領域を表す。"機能的"ドメインとは、他の蛋白質に対するアミノ酸配列ホモロジーから、または特定の構造的コンフォメーションを与えるであろうアミノ酸配列の存在（例えばN末端ドメイン）により、制御的または触媒的役割を果たすであろう、ポリペプチドの任意の領域を意味する。C末端ドメインは、非重複蛋白質データベースに対して蛋白質配列のスミス・ウォーターマンアライメントを用いて、触媒ドメインまたは任意の機能的なC末端の触媒外ドメインのC末端境界を規定することにより同定することができる。その長さおよびアミノ酸組成に依存して、C末端ドメインは、ホスファターゼ機能において制御的機能を果たすかもしれないし果たさないかもしれない。本発明のいくつかのホ

スファターゼについては、C末端ドメインはまた触媒ドメインを含むかもしれない(上述)。

【0030】

本明細書において用いる場合、"C末端テール"との用語は、ホモロジーにより、その最も近いホモログのC末端アミノ酸を越えて伸長または突出している蛋白質ホスファターゼのC末端ドメインを表す。C末端テールは、蛋白質配列を非重複蛋白質データベースに対してスミス-ウォーターマン配列アラインメントを用いることにより、またはDNASTARプログラムMegalignを用いる相同な配列の多重配列アラインメントにより、同定することができる。C末端テールは、その長さに依存して、ホスファターゼ機能において制御的役割を果たすかもしれないし果たさないかもしれない。

【0031】

本明細書において用いる場合、"コイルドコイル構造領域"との用語は、コンピュータアルゴリズム、例えばCOILS(Lupas, A. (1996) Meth. Enzymology 266:513-525)により推定してコイルドコイル構造をとる可能性が高いポリペプチド配列を表す。コイルドコイルは、平行な2または3個の両親媒性 - ヘリックスから形成される。コイルドコイルは、他のポリペプチドのコイルドコイルドメインと結合してホモ二量体またはヘテロ二量体を生ずることができる(Lupas, A. (1991) Science 252:1162-1164)。

【0032】

本明細書において用いる場合、"プロリンリッチ領域"との用語は、蛋白質ホスファターゼの、所定のアミノ酸長さにわたるプロリン含量が蛋白質において見いだされるこのアミノ酸の平均含量より高い(すなわち、>10%)領域を表す。プロリンリッチ領域は、アミノ酸配列を目で調べることにより容易に識別され、標準的なコンピュータ配列分析プログラム、例えばDNASTARプログラムEditSeqにより定量することができる。プロリンリッチ領域は、制御蛋白質と蛋白質との相互作用に關与することが示されている。

【0033】

本明細書において用いる場合，"スペーサー領域"との用語は，予測される機能的ドメインの間に位置する蛋白質ホスファターゼの領域を表す。スペーサー領域は，データベース中の任意のアミノ酸配列に対する検出可能なホモロジーを有しない。これは，非重複蛋白質データベースに対して蛋白質配列のスミスウォーターマンアラインメントを用いて，これを挟む機能的ドメインのCおよびN末端境界を規定することにより同定することができる。スペーサー領域は，蛋白質ホスファターゼ機能において基本的な機能を果たすかもしれないかもしれない。

【0034】

本明細書において用いる場合，"挿入物"との用語は，密接なホモログ中にはない蛋白質ホスファターゼの一部を表す。挿入物は，エクソンの選択的スプライシングの産物であるかもしれないしそうではないかもしれない。挿入物は，蛋白質配列の非重複蛋白質データベースに対するスミス - ウォーターマン配列アラインメントを用いて，またはDNASTARプログラムMegalignを用いる相同な配列の多重配列アラインメントにより，同定することができる。挿入物は，蛋白質 - 蛋白質相互作用のための新規な伝達手段を提示することにより，またはそのような相互作用を妨害することにより，機能的役割を果たすかもしれない。

【0035】

"シグナル伝達経路"との用語は，細胞外シグナルを細胞膜を通して伝播し，細胞内シグナルとなる分子を表す。このシグナルは，次に細胞性応答を刺激することができる。シグナル伝達プロセスに参与するポリペプチド分子は，典型的にはレセプターおよび非レセプター蛋白質チロシンホスファターゼ，レセプターおよび非レセプター蛋白質ホスファターゼ，SRCホモロジー2および3ドメインを含むポリペプチド，ホスホチロシン結合蛋白質（SRCホモロジー2（SH2）およびホスホチロシン結合（PTBおよびPH）ドメイン含有蛋白質），プロリンリッチ結合蛋白質（SH3ドメイン含有蛋白質），GTPase，ホスホジエステラーゼ，ホスホリパーゼ，プロリルイソメラーゼ，プロテアーゼ，Ca²⁺結合蛋白質，cAMP結合蛋白質，グアニルシクラーゼ，アデニルシクラーゼ，NO生成蛋白質，ヌクレオチド交換因子および転写因子である。

【0036】

別の好ましい態様においては、本発明は、ホスファターゼポリペプチドをコードし、宿主細胞において転写を開始するのに有効なベクターまたはプロモーターをさらに含む、単離された、濃縮されたまたは精製された核酸分子を特徴とする。本発明はまた、組換え核酸を特徴とし、これは好ましくは細胞または生物内にある。組換え核酸は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12に記載される配列からなる群より選択される配列、またはその機能的誘導体、および宿主細胞において転写を開始させるのに有効なベクターまたはプロモーターを含むことができる。あるいは、組換え核酸は、細胞において機能的な転写開始領域、ホスファターゼポリペプチドをコードするRNA配列に相補的な配列および細胞において機能的な転写終止領域を含んでもよい。特定のベクターおよび宿主細胞の組み合わせは本明細書において議論される。

【0037】

"ベクター"との用語は、細胞にトランスフェクトすることができ、細胞ゲノム中でまたはそれとは独立に複製しうる一本鎖または二本鎖の環状核酸分子を表す。環状二本鎖核酸分子は、制限酵素で処理することにより切断し、したがって直鎖状にすることができる。核酸ベクターの分類、制限酵素、および制限酵素により切断されるヌクレオチド配列の知識は、当業者には容易に入手可能である。ホスファターゼをコードする核酸分子は、ベクターを制限酵素で切断し、2つの断片を一緒にライゲーションすることにより、ベクター中に挿入することができる。

【0038】

"トランスフェクトする"との用語は、核酸ベクターまたは他の核酸分子を細胞性生物中に挿入する多数の方法を規定する。これらの方法には、種々の手法が含まれ、例えば、細胞を高濃度の塩、電界、界面活性剤、またはDMSOで処理することにより、細胞の外膜または壁を目的の核酸分子に対して透過性にする、または種々のウイルス伝達戦略を用いることが含まれる。

【0039】

本明細書において用いる場合，"プロモーター"との用語は，遺伝子配列の発現に必要な核酸配列を表す。プロモーター領域は生物によって様々であるが，種々の生物について当業者によく知られている。例えば，原核生物においては，プロモーター領域は，プロモーター（RNA転写の開始を指示する）ならびに，RNAに転写されたときに合成の開始を合図するDNA配列の両方を含む。そのような領域は，通常は転写および翻訳の開始に関与する5'非コーディング配列，例えばTATAボックス，キャッピング配列，CAAT配列等を含む。

【0040】

好ましい態様においては，単離された核酸は，配列番号1，配列番号2，配列番号3，配列番号4，配列番号5，配列番号6，配列番号7，配列番号8，配列番号9，配列番号10，配列番号11，および配列番号12に記載される配列からなる群より選択される核酸配列を含むか，本質的にそれからなるか，それからなり，かつ，配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列，その機能的誘導体，または配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも35，40，45，50，60，75，100，200，または300個の連続するアミノ酸をコードする。核酸は，cDNAクローニングにより，またはサブトラクティブハイブリダイゼーションにより，天然の起源から単離することができる。天然の起源は哺乳動物であることができ，好ましくはヒト，好ましくは血液，精液または組織であり，核酸はトリエステル法によりまたは自動化DNA合成機を用いることにより合成してもよい。

【0041】

"哺乳動物"とは，好ましくはマウス，ラット，ウサギ，モルモット，ヒツジ，およびヤギ等の生物を表し，より好ましくはネコ，イヌ，有尾サル，および無尾

サルを表し、最も好ましくはヒトを表す。

【0042】

さらに別の好ましい態様においては、核酸は、例えば、追加のポリペプチドの同定およびクローニングを容易にするためのハイブリダイゼーションプローブを設計するのに、追加のポリペプチドのクローニングを容易にするためのPCRプローブを設計するのに、ポリペプチド領域に対する抗体を得るために、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計するのに有用な、保存されたまたは独特の領域である。

【0043】

"保存された核酸領域"とは、ホスファターゼポリペプチドをコードする2つまたはそれ以上の核酸に存在する領域を意味し、特定の核酸配列は低いストリンジエンシー条件下でこの領域にハイブリダイズすることができる。ホスファターゼポリペプチドをコードする核酸のスクリーニングに適した低ストリンジエンシー条件の例は、Wahl et al. Meth. Enzym. 152:399-407 (1987) および Wahl et al. Meth. Enzym. 152:415-423 (1987) (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する) に提供される。好ましくは、保存領域は、20ヌクレオチド中5個以下で異なり、より好ましくは20ヌクレオチド中2個、最も好ましくは20ヌクレオチド中1個が異なる。

【0044】

"独特の核酸領域"とは、ホスファターゼポリペプチドをコードする核酸中に存在し、天然に生ずる任意の他のポリペプチドをコードする配列中には存在しない配列を意味する。そのような領域は、好ましくは配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される全長アミノ酸配列に記載される32個(好ましくは40個, より好ましくは45個, 最も好ましくは55個) またはそれ以上の連続するアミノ酸をコードする。特に、独特の核酸領域は、好ましくは哺乳動物起源のものである。

【0045】

本発明の別の観点は、試料において、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドをコードする核酸を検出するための核酸プローブを特徴とする。核酸プローブは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12、またはその機能的誘導体に記載される配列からなる群より選択される配列にハイブリダイズするであろうヌクレオチド塩基配列を含む。

【0046】

好ましい態様においては、核酸プローブは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列またはその機能的誘導体からなる群より選択される全長配列の、少なくとも12、32、75、90、105、120、150、200、250、300または350個の連続するアミノ酸をコードする核酸にハイブリダイズする。

【0047】

プローブを使用する方法には、ハイブリダイゼーションが生ずるような条件下で試料を核酸プローブと接触させ、ホスファターゼRNAに結合したプローブの存在または量を検出することにより、試料中のホスファターゼRNAの存在または量を検出することが含まれる。プローブとホスファターゼポリペプチドをコードする核酸配列との間に形成される核酸デュプレックスを、検出された核酸の配列の同定において用いることができる(Nelson et al., Non isotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, Kricka, ed., p. 275, 1992 (図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する

)。そのような方法を実施するためのキットは、その中に核酸プローブが置かれている容器手段を含むように構築することができる。

【0048】

別の観点においては、本発明は、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドをコードする核酸分子を含む組換え細胞または組織を記述する。そのような細胞においては、核酸は遺伝的制御要素の制御下にあってもよく、または外来性プロモーターを含む外来性制御要素の制御下にあってもよい。"外来性"とは、通常はホスファターゼポリペプチドのコーディング配列とインピボで転写的にカップリングしていないプロモーターを意味する。

【0049】

ポリペプチドは、好ましくは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される全長アミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである。"フラグメント"とは、ホスファターゼポリペプチド中に存在するアミノ酸配列を意味する。好ましくは、そのような配列は、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される全長配列の、少なくとも32、45、50、60、100、200、または300個の連続するアミノ酸を含む。

【0050】

別の観点においては、本発明は、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、単離された、濃

縮されたまたは精製されたホスファターゼポリペプチドを特徴とする。

【0051】

ポリペプチドに関して"単離された"とは、互いに結合した6個(好ましくは12個, より好ましくは18個, 最も好ましくは25, 32, 40, または50個)またはそれ以上のアミノ酸のポリマーを意味し、天然起源から単離されたポリペプチドまたは合成されたポリペプチドが含まれる。ある種の観点においては、より長いポリペプチド、例えば、配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される全長配列の、100, 200, 300, 400, 450, 500, 550, 600, 700, 800, 900個またはそれ以上の連続するアミノ酸を含むものが好ましい。

【0052】

本発明の単離されたポリペプチドは、天然には純粋なまたは分離された形で見いだされない点において独特である。"単離された"との用語の使用は、天然に生ずる配列がその正常な細胞性環境から除かれていることを示す。すなわち、配列は、無細胞溶液中にあってもよく、異なる細胞性環境に置かれていてもよい。この用語は、その配列が存在する唯一のアミノ酸鎖であることを意味するものではなく、配列が天然にこれに付随する非アミノ酸物質を本質的に含まない(少なくとも約90-95%純粋)ことを意味する。

【0053】

ポリペプチドに関して使用する場合、"濃縮された"との用語は、特定のアミノ酸配列が、正常または疾病細胞におけるより、または配列が由来する細胞におけるより、目的とする細胞または溶液中に存在する総アミノ酸配列の有意に高い割合(2-5倍)を占めることを意味する。これは、存在する他のアミノ酸配列の量の優先的減少により、または目的とする特定のアミノ酸配列の量の優先的増加により、またはこれら2つの組み合わせにより、人が生じさせることができる。しかし、濃縮されたとは、他のアミノ酸配列が存在しないことを意味するものではなく、単に目的とする配列の相対的な量が有意に増加していることを意味する

ことに注意すべきである。本明細書において"有意"にこの用語は、増加のレベルがそのような増加を作成した人にとって有用であることを示し、一般に、他のアミノ酸配列と比較して少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも5 - 10倍、またはそれより多い増加を意味する。この用語はまた、他の起源からのアミノ酸配列が存在しないことを意味するものではない。アミノ酸配列の他の起源は、例えば、酵母または細菌のゲノム、またはクローニングベクター、例えばpUC19によりコードされるアミノ酸配列を含みうる。この用語は、人が介在して所望のアミノ酸配列の比率を増加させる状況のみをカバーすることを意味する。

【0054】

ある目的のためには、アミノ酸配列が精製された形であることも有利である。ポリペプチドに関して"精製された"この用語は絶対的純度（例えば均一調製物）を要求するものではなく、この用語は配列が天然の環境におけるより比較的純粋であることを示す。天然のレベルと比較して、このレベルは少なくとも2 - 5倍高くあるべきである（例えばmg/mLで）。少なくとも1桁の精製、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁の精製が明示的に意図される。物質は、好ましくは機能的に有意なレベルで夾雑物を含まず、例えば、90%、95%、または99%純粋である。

【0055】

好ましい態様においては、ホスファターゼポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択される全長アミノ酸配列によりコードされる蛋白質のフラグメントである。好ましくは、ホスファターゼポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列、またはその機能的誘導体からなる群より選択される全長配列の、少なくとも32、45、50、60、100、200、または300個の連続するアミノ酸を含む。

【0056】

好ましい態様においては、ホスファターゼポリペプチドは、

(a) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列; および

(b) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列であって、ただし、C末端触媒ドメイン, N末端ドメイン, 触媒ドメイン, C末端ドメイン, コイルドコイル構造領域, プロリンリッチ領域, スペーサー領域, およびC末端テールからなる群より選択されるドメインの1またはそれ以上が欠失している配列;

を有するアミノ酸配列を含む。

【0057】

ポリペプチドは、当該技術分野においてよく知られる方法により、天然の起源から単離することができる。天然の起源は哺乳動物であることができ、好ましくはヒト、血液、精液、または組織であり、またはポリペプチドは自動化ポリペプチド合成機を用いて合成してもよい。

【0058】

ある態様においては、本発明は、(a) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する組換えホスファターゼポリペプチドを含む。"組換えホスファターゼポリペプチド"とは、その存在位置(例えば、天然に見いだされる物とは異なる細胞または組織に存在)、純度または構造において天然に生ずるポリペプチドと区別されるように、組換えDNA技術により製造されるポリペプチドを意味する。一般に、そのような組換えポリペプチドは、天然に通常観察される量とは異なる量で細胞中に存在す

るであろう。

【0059】

宿主細胞中で発現させるべきポリペプチドは、異種蛋白質からの領域を含む融合蛋白質であってもよい。そのような領域を含むことにより、例えば、分泌させ、安定性を改良し、またはポリペプチドの精製を容易にすることができる。例えば、適当なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクター中に組み込むことができる。シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNA配列を、ポリペプチドがシグナルペプチドを含む融合蛋白質として翻訳されるように、ポリヌクレオチド配列にインフレームで融合させることができる。意図する宿主細胞において機能的であるシグナルペプチドは、ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。好ましくは、シグナル配列はポリペプチドが細胞から分泌される際にポリペプチドから切断される。すなわち、ホスファターゼポリペプチドのN末端が運搬ペプチドに融合されている好ましい融合蛋白質を作成することができる。

【0060】

1つの態様においては、ポリペプチドは、ポリペプチドの精製を容易にするために用いられる異種領域を含む融合蛋白質を含む。そのような機能のために用いられる入手可能なペプチドの多くは、融合蛋白質が結合パートナーに選択的に結合することを可能とする。好ましい結合パートナーには、プロテインAのIgG結合ドメインの1またはそれ以上が含まれ、融合蛋白質は、IgG結合セファローズ等のアフィニティークロマトグラフィーにより容易に均一にまで精製される。あるいは、多くのベクターは、標的蛋白質のN末端またはC末端で発現されることができるヒスチジン残基のストレッチを有するという利点を有しており、したがって、金属キレート化クロマトグラフィーにより目的とする蛋白質を回収することができる。蛋白質加水分解酵素、例えばエンテロホスファターゼ、ファクターXプロコラゲナーゼまたはトロンビンの認識部位をコードするヌクレオチド配列をホスファターゼポリペプチドの配列のすぐ上流に配置すると、融合蛋白質を切断して成熟ホスファターゼポリペプチドを得ることができる。融合蛋白質結合パートナーのさらなる例には、限定されないが、酵母I-因子、sf9昆虫細胞におけるミツバチメラチンリーダー、6-Hisタグ、チオレドキシントグ、

ヘマグルチニンタグ，GSTタグ，およびOmp Aシグナル配列タグが含まれる。当業者には理解されるように，ペプチドを認識しこれに結合する結合パートナーは，任意のイオン，分子または化合物であることができ，例えば金属イオン（例えば金属アフィニティーカラム），抗体，またはそのフラグメント，およびペプチドに結合する任意の蛋白質またはペプチド，例えばFLAGタグが含まれる。

【0061】

別の観点においては，本発明は，ホスファターゼポリペプチドまたはホスファターゼポリペプチドドメインまたはフラグメントに対して特異的結合親和性を有する抗体（例えば，モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体）を特徴とし，ここで，ポリペプチドは，配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択される。"特異的結合親和性"とは，抗体が，特定の条件下において，他のポリペプチドに結合するより高い親和性をもって標的ホスファターゼポリペプチドに結合することを意味する。抗体または抗体フラグメントは，他のポリペプチドに結合しうる領域を含むポリペプチドである。"特異的結合親和性"との用語は，特定の条件下で，他のポリペプチドに結合するより高い親和性をもってホスファターゼポリペプチドに結合する抗体を記述する。抗体を用いて，ホスファターゼポリペプチドの内因性起源を同定して，細胞サイクル制御をモニターすることができ，または，ホスファターゼポリペプチドの細胞中の免疫局在化に用いることができる。

【0062】

"ポリクローナル"との用語は，抗原またはその抗原性機能的誘導体で免疫した動物の血清から誘導される抗体分子の異成分集団である抗体を表す。ポリクローナル抗体の製造のためには，種々の宿主動物に抗原を注射することにより免疫することができる。宿主の種により，種々のアジュバントを用いて免疫学的応答を増加させることができる。

【0063】

"モノクローナル抗体"は、特定の抗原に対する抗体の実質的に均一な集団である。モノクローナル抗体は、培養連続細胞株による抗体分子の生成を与える任意の技術により得ることができる。モノクローナル抗体は、当業者に知られる方法により得ることができる(Kohler et al. Nature 256: 495 - 497, 1975, および米国特許4,376,110(これらの両方は、図面または表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する))。

【0064】

"抗体フラグメント"との用語は、特定の分子に対して特異的結合親和性を表示する抗体の一部、しばしば超可変領域および周囲の重鎖および軽鎖の一部を表す。超可変領域は、抗体のポリペプチド標的に物理的に結合する部分である。

【0065】

本発明のホスファターゼポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントは、試料をホスファターゼ-抗体免疫複合体の形成に適した条件下で抗体で探索し、ホスファターゼポリペプチドに結合した抗体の存在および/または量を検出することにより、試料中のホスファターゼポリペプチドの存在および/または量を検出する方法において用いることができる。そのような方法を実施するための診断キットは、ホスファターゼに特異的な抗体または抗体フラグメント、ならびに抗体の結合パートナーまたは抗体それ自体のコンジュゲートを含むように構築することができる。

【0066】

本発明のホスファターゼポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体または抗体フラグメントは、原核生物または真核生物から単離、濃縮、または精製することができる。当業者に知られる日常的な方法により、原核生物および真核生物の両方において、抗体または抗体フラグメントを製造することができる。ポリペプチド分子である抗体の精製、濃縮および単離は、上に記載される。

【0067】

本発明のホスファターゼポリペプチドに対して特異的結合親和性を有する抗体は、免疫複合体が形成するような条件下で試料を抗体と接触させ、ホスファターゼポリペプチドに結合した抗体の存在および/または量を検出することにより、

試料中のホスファターゼポリペプチドの存在および/または量を検出するための方法において用いることができる。そのような方法を実施するための診断キットは、抗体を含む第1の容器および抗体の結合パートナーおよび標識（例えば放射性同位体）を含む第2の容器を含むように構築することができる。診断キットはまた、FDAに認可された使用の通知およびその指針を含んでいてもよい。

【0068】

別の観点においては、本発明は、ホスファターゼポリペプチドまたはホスファターゼポリペプチドドメインに対して特異的結合親和性を有する抗体を産生するハイブリドーマを特徴とし、ここで、ポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択される。"ハイブリドーマ"とは、抗体、例えば本発明のホスファターゼに対する抗体を分泌しうる不死化細胞株を意味する。好ましい態様においては、ホスファターゼに対する抗体は、本発明のホスファターゼポリペプチドに特異的に結合することができるアミノ酸の配列を含む。

【0069】

別の観点においては、本発明はまた、上述したいずれかの核酸分子によりコードされるポリペプチドに結合する抗体、および負対照抗体を含むキットに関する。

【0070】

"負対照抗体"との用語は、特異的結合親和性を有する抗体と類似の起源に由来するが、本発明のポリペプチドに対して結合親和性を示さない抗体を表す。

【0071】

別の観点においては、本発明は、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択されるホスファターゼポリペプチドに結合することができるホスファターゼポリペプチ

ド結合剤を特徴とする。結合剤は、好ましくは、本発明のホスファターゼポリペプチド上に存在するエピトープを認識する精製された抗体である。他の結合剤には、ホスファターゼポリペプチドに結合する分子およびホスファターゼポリペプチドに結合する類似の分子が含まれる。そのような結合剤は、ホスファターゼ結合パートナー活性を測定するアッセイを用いて同定することができる。

【0072】

本発明はまた、本発明のホスファターゼポリペプチドまたは同等の配列を含むヒト細胞をスクリーニングする方法を特徴とする。該方法は、当該技術分野において日常的かつ標準的な技術、例えば本発明のホスファターゼの同定のために本明細書において記載される技術（例えば、クローニング、サザンまたはノザンプロット分析、インシトゥーハイブリダイゼーション、PCR増幅等）を用いて、ヒト細胞において新規ポリペプチドを同定することを含む。

【0073】

別の観点においては、本発明は、ホスファターゼ活性を調節する物質を同定する方法を特徴とする。該方法は、(a) 配列番号13, 配列番号14, 配列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択されるホスファターゼポリペプチドを試験物質と接触させ；(b) 前記ポリペプチドの活性を測定し；そして(c) 前記物質が前記ポリペプチドの活性を調節するかどうかを判定する、の各工程を含む。

【0074】

"調節する"との用語は、化合物が本発明のホスファターゼの機能を変化させる能力を表す。調節剤は、好ましくは、ホスファターゼに暴露される化合物の濃度に依存して本発明のホスファターゼの活性を活性化するかまたは阻害する。

【0075】

"調節する"との用語はまた、ホスファターゼと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される確率を増加または減少させることにより、本発明のホスファターゼの機能を変更することを表す。調節剤は、好ましくは、ホスファターゼと

天然の結合パートナーとの間にそのような複合体が形成される確率を増加させ、より好ましくは、ホスファターゼに暴露される化合物の濃度に依存してホスファターゼと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される確率を増加または減少させ、最も好ましくは、ホスファターゼと天然の結合パートナーとの間に複合体が形成される確率を減少させる。

【0076】

"活性化する"との用語は、ホスファターゼの細胞活性を増加させることを表す。阻害するとの用語は、ホスファターゼの細胞活性を減少させることを表す。ホスファターゼ活性は、好ましくは、天然の結合パートナーとの相互作用である。

【0077】

"複合体"との用語は、互いに結合した少なくとも2つの分子の集合を表す。シグナル伝達複合体は、しばしば、互いに結合した少なくとも2つの蛋白質分子を含む。

【0078】

"天然の結合パートナー"との用語は、細胞中でホスファターゼに結合するポリペプチド、脂質、小分子、または核酸を表す。ホスファターゼと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化は、相互作用が形成される確率の増加または減少、またはホスファターゼ/天然の結合パートナー複合体の濃度の増加または減少として現れることができる。

【0079】

本明細書において用いる場合、"接触させる"との用語は、試験化合物を含む溶液を、本発明の方法の細胞を浸している液体培地と混合することを表す。化合物を含む溶液はまた、該方法の細胞内への試験化合物の取り込みを容易にする他の成分、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)を含んでいてもよい。試験化合物を含む溶液は、輸送装置、例えば、ピペットに基づく装置またはシリンジに基づく装置を用いて、細胞を浸している培地に加えることができる。

【0080】

別の観点においては、本発明は、細胞においてホスファターゼ活性を調節する物質を同定する方法を特徴とする。該方法は、(a)細胞においてホスファター

ゼポリペプチドを発現させ、ここで前記ポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する群から選択され；(b)試験物質を前記細胞に加え；そして(c)細胞表現型または前記ポリペプチドと天然の結合パートナーとの間の相互作用の変化をモニターする、の各工程を含む。

【0081】

本明細書において用いる場合、"発現"との用語は、細胞中でホスファターゼ遺伝子を含む核酸ベクターから本発明のホスファターゼが産生されることを表す。本明細書に記載されるように、核酸ベクターを、当該技術分野においてよく知られる手法を用いて細胞中にトランスフェクトする。

【0082】

本発明の別の観点は、本発明のホスファターゼポリペプチドに結合する化合物を同定する方法に関する。該方法は、ホスファターゼポリペプチドを化合物と接触させ、化合物がホスファターゼポリペプチドに結合するか否かを判定することを含む。結合は、当業者によく知られる結合アッセイ、例えば、限定されないが、ゲルシフトアッセイ、ウエスタンブロット、放射性標識競合アッセイ、ファージに基づく発現クローニング、クロマトグラフィーによる共分画、共沈澱、架橋、相互作用トラップ/ツーハイブリッド分析、サウスウエスタン分析、ELISA等により判定することができる。このようなアッセイは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, NY (その全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。スクリーニングすべき化合物には、限定されないが、細胞外、細胞内、生物学的または化学的起源の化合物が含まれる。

【0083】

本発明の方法はまた、標識、例えば放射性標識(例えば ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^3P 、 ^3H)、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識および免疫学的標識に結合した化合物を包含する。そのような試験において用いるホスファターゼポリペプチド

は、溶液中で遊離であってもよく、固体支持体に結合していてもよく、細胞表面上に存在してもよく、細胞内に存在してもよく、または細胞の一部に付随していてもよい。当業者は、例えば、ホスファターゼポリペプチドと試験化合物との間の複合体の形成を測定することができる。あるいは、当業者は、試験化合物により引き起こされる、ホスファターゼポリペプチドとその基質との間の複合体形成の減少を調べることができる。

【0084】

他のアッセイを用いて、酵素活性を調べることができる。これには、限定されないが、測光法、放射線法、HPLC、電気化学的方法等が含まれ、これは、例えば、Enzyme Assays: A Practical Approach, eds. R. E. Szent-Gyorgyi and M. J. Danson, 1992, Oxford University Press (その全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載されている。

【0085】

本発明の別の観点では、ホスファターゼポリペプチドを化合物と接触させ、化合物がホスファターゼポリペプチドの活性を調節するか否かを判定することを含む、ホスファターゼポリペプチドの活性を調節する(すなわち、増加または減少させる)化合物を同定する方法に関する。これらの化合物はまた、"蛋白質ホスファターゼの調節剤"と称される。試験化合物の存在下における活性を、試験化合物の非存在下における活性に対して測定する。試験化合物を含む試料の活性が試験化合物を含まない試料の活性より高い場合、その化合物は活性を増加させたのであろう。同様に、試験化合物を含む試料の活性が試験化合物を含まない試料の活性より低い場合、その化合物は活性を阻害したのであろう。

【0086】

本発明は、種々の薬剤スクリーニング手法のいずれかにおいてホスファターゼポリペプチドを用いて化合物をスクリーニングするのに特に有用である。スクリーニングすべき化合物には、限定されないが、細胞外、細胞内、生物学的または化学的起源のものが含まれる。そのような試験において用いるホスファターゼポリペプチドは、任意の形状であることができ、好ましくは、溶液中で遊離してい

るか、固体支持体に結合しているか、細胞表面上に存在するか、または細胞内に存在する。当業者は、例えば、ホスファターゼポリペプチドと試験化合物の間の複合体の形成を測定することができる。あるいは、当業者は、試験化合物により引き起こされる、ホスファターゼポリペプチドとその基質との間の複合体形成の減少を調べることができる。

【0087】

本発明のホスファターゼポリペプチドの活性は、例えば、化学的に合成されたペプチドリガンドに結合するかまたはそれにより活性化される能力を調べることにより決定することができる。あるいは、ホスファターゼポリペプチドの活性は、カルシウム等の金属イオン、ホルモン、ケモカイン、神経ペプチド、神経伝達物質、ヌクレオチド、脂質、臭気物質、および光子に結合する能力を調べることによりアッセイすることができる。すなわち、ホスファターゼポリペプチドの活性の調節剤は、ホスファターゼの機能、例えばホスファターゼの結合特性またはシグナル伝達等の活性または膜局在を変化させるであろう。

【0088】

本発明の方法の種々の態様においては、アッセイは、酵母成長アッセイ、エクオリンアッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、有糸分裂促進アッセイ、MAPホスファターゼ活性アッセイ、ならびに当該技術分野において一般に知られている結合または機能に基づくホスファターゼ活性の他のアッセイの形をとることができる。これらの態様のいくつかにおいては、本発明は、レセプターおよび非レセプター蛋白質チロシンホスファターゼ、レセプターおよび非レセプター蛋白質ホスファターゼ、SRCホモロジー2および3ドメインを含有するポリペプチド、ホスチロシン結合蛋白質(SRCホモロジー2(SH2)およびホスチロシン結合(PTBおよびPH)ドメイン含有蛋白質)、プロリンリッチ結合蛋白質(SH3ドメイン含有蛋白質)、GTPases、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、プロリルイソメラーゼ、プロテアーゼ、Ca²⁺結合蛋白質、cAMP結合蛋白質、グアニルシクラーゼ、アデニルシクラーゼ、NO生成蛋白質、ヌクレオチド交換因子、および転写因子の任意のものを含む。本発明にしたがうホスファターゼの生物学的活性には、限定されないが、天然のまたは合成のリガ

ンドの結合，ならびに当該技術分野において知られるホスファターゼの機能的活性のいずれかが含まれる。ホスファターゼ活性の非限定的例には，ホスファターゼ結合相互作用および/またはシグナル伝達に及ぼす影響を含む種々の形の貫膜シグナリングが含まれる。

【0089】

本発明の調節剤は，種々の化学構造を示し，これは一般に，天然のホスファターゼリガンドの模倣体，およびホスファターゼのペプチドおよび非ペプチドアロステリックエフェクターに分類することができる。本発明は適切な調節剤の起源を限定するものではなく，これは，天然起源，例えば植物，動物または無機抽出物，または非天然起源，例えば小分子ライブラリ（コンビナトリアル化学方法により構築したライブラリを含む）およびペプチドライブラリから得ることができる。

【0090】

ホスファターゼをコードするcDNAを薬剤発見において用いることはよく知られている。ハイスループットスクリーニング（HTS）において1日に数千種類の未知の化合物を試験することができるアッセイが詳細に提供されている。文献は，薬剤発見のためにHTS結合アッセイにおいて放射性標識リガンドを使用する例を多数記載している（Williams, Medicinal Research Reviews, 1991, 11, 147-184を参照；総説については，Sweetnam, et al., J. Natural Products, 1993, 56, 441-455）。結合アッセイHTSのためには，組換えレセプターが好ましい。これは特異性がより高く（より高い相対純度），大量のレセプター材料を生成する能力を提供し，広範な種類のフォーマットで用いることができるためである（Hodgson, Biol Technology, 1992, 10, 973-980を参照；その全体を本明細書の一部としてここに引用する）。

【0091】

組換えレセプターの機能的発現には種々の異種システムが利用可能であり，当業者にはよく知られている。そのようなシステムには，細菌（Strosber

g, et al., Trends in Pharmacological Sciences, 1992, 13, 95-98), 酵母 (Pausch, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 487-494), 何種類かの昆虫細胞 (Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology, 1996, 164, 189-268), 両生類細胞 (Jayawickreme et al., Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8, 629-634) およびいくつかの哺乳動物細胞株 (CHO, HEK293, COS等; Gerhardt, et al., Eur. J. Pharmacology, 1997, 334, 1-23を参照) が含まれる。これらの例は他の可能な細胞発現システム, 例えば線虫から得られる細胞株を使用することを排除するものではない (PCT出願WO98/37177)。

【0092】

発現されたホスファターゼを, その規定されたりガンド (この場合にはこれを活性化する対応するペプチド) とともにHTS結合アッセイにおいて用いることができる。同定されたペプチドは, 適当な放射性同位体, 例えば, 限定されないが, ^{125}I , ^3H , ^{35}S または ^{32}P で, 当業者によく知られる方法により標識する。あるいは, ペプチドは, 適当な蛍光誘導体を用いてよく知られる方法により標識してもよい (Baindur, et al., Drug Dev. Res., 1994, 33, 373-398; Rogers, Drug Discovery Today, 1997, 2, 156-160)。組換え蛋白質を発現する細胞株から作成した膜調節物において, レセプターに特異的に結合する放射活性リガンドは, いくつかの標準的な方法の1つ, 例えば, レセプター-リガンド複合体を濾過して結合したリガンドを未結合リガンドから分離する方法において, HTSアッセイにより検出することができる (Williams, Med. Res. Rev., 1991, 11, 147-184.; Sweetnam, et al., J. Natural Products, 1993, 56, 441-455)。別の方法としては, シンチレーション近接アッセイ (SPA) またはそのような分離を必要としないフラッシュプレート (Flash Plate) フォー

マットが挙げられる (Nakayama, Cur. Opinion Drug Disc. Dev., 1998, 1, 85-91; Bosse, et al., J. Biomolecular Screening, 1998, 3, 285-292.)。蛍光リガンドの結合は, 例えば, 蛍光エネルギー転移 (FRET), 結合したリガンドの直接分光蛍光分析, または蛍光分極等の種々の方法により検出することができる (Rogers, Drug Discovery Today, 1997, 2, 156-160; Hill, Cur. Opinion Drug Disc. Dev., 1998, 1, 92-97)。

【0093】

ホスファターゼおよび異種ホスファターゼポリペプチドの機能的発現に必要な天然の結合パートナーは, 宿主細胞の天然の構成物であってもよく, またはよく知られる組換え技術により導入してもよい。ホスファターゼポリペプチドは無傷であってもよく, キメラであってもよい。ホスファターゼ活性化により他の天然蛋白質が刺激または阻害され, これらの事象を測定可能な応答に連結させることができる。

【0094】

そのような生物学的応答の例には, 限定されないが, 以下のものが含まれる: 特別に遺伝子工学処理した酵母細胞において制限栄養の非存在下で生存する能力 (Pausch, Trends in Biotechnology, 1997, 15, 487-494); 蛍光色素により測定される細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化 (Murphy, et al., Cur. Opinion Drug Disc. Dev., 1998, 1, 192-199)。蛍光の変化を用いてリガンド誘導性の膜電位または細胞内 pH の変化をモニターすることもできる。このような目的のために HTS のための自動化システムが記載されている (Schroeder, et al., J. Biomolecular Screening, 1996, 1, 75-80)。共通のセカンドを測定するためのアッセイもまた利用可能であるが, これらは一般的には HTS には好ましくない。

【0095】

本発明は, ホスファターゼポリペプチドに結合するリガンドの阻害剤をスクリ

ーニングし同定する多数のアッセイを企図する。1つの例においては、ホスファターゼポリペプチドを固定化し、候補調節剤、例えば阻害剤化合物の存在下および非存在下において、結合パートナーとの相互作用を評価することができる。別の例においては、ホスファターゼポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用は、溶液アッセイにおいて、候補阻害剤化合物の存在下および非存在下の両方で評価することができる。いずれのアッセイにおいても、阻害剤はホスファターゼポリペプチドとその天然の結合パートナーとの間の結合を減少させる化合物として同定される。別の企図されるアッセイには、PCT国際公開WO95/20652(1995年8月3日公開; 図面および表を含め本明細書の一部としてここに引用する)に記載されるような、トランスフォームしたまたはトランスフェクトした宿主細胞におけるポジティブシグナルの検出により蛋白質/蛋白質相互作用の阻害剤を同定する、ジハイブリッドアッセイの変種が含まれる。

【0096】

本発明により企図される調節剤の候補には、潜在的活性化剤または潜在的阻害剤のいずれかのライブラリから選択される化合物が含まれる。小分子調節剤の同定に用いられる多くの多様なライブラリが存在し、これには、例えば、(1)化学ライブラリ、(2)天然産物ライブラリ、および(3)ランダムペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機分子から構成されるコンビナトリアルライブラリが含まれる。化学ライブラリはランダムな化学構造から構成され、その一部は既知の化合物の類似体または他の薬剤発見スクリーニングにおいて"ヒット"または"リード"として同定された化合物の類似体であるが、別のものは天然産物から誘導され、さらに別のものは、無指向性有機合成化学から生ずる。天然産物ライブラリは、(1)土壌、植物または海洋生物からの培養液の発酵および抽出、または(2)植物または海洋生物の抽出、によりスクリーニング用の混合物を作成するために用いられる、微生物、動物、植物、または海洋生物の収集物である。天然産物ライブラリには、ポリケタイド、非リボソームペプチド、およびそれらの変種(天然に生じない)が含まれる。総説については、*Science* 282:63-68(1998)を参照。コンビナトリアルライブラリは、混合物としての多数のペプチド、オリゴヌクレオチド、または有機化合物から構成される。

これらのライブラリは、伝統的自動化合成法、PCR、クローニング、または私有の合成法により比較的容易に製造することができる。特に興味深いものは非ペプチドコンビナトリアルライブラリである。さらに興味深い他のライブラリには、ペプチド、蛋白質、ペプチド模倣物、多重平行合成収集物、リコンビナトリアル、およびポリペプチドライブラリが含まれる。コンビナトリアルケミストリおよびこれから作成されるライブラリの総説については、Myers, Curr. Opin. Biotechnol. 8:701-707(1997)を参照。本明細書に記載される、種々のライブラリを用いる調節剤の同定により、候補物質である"ヒット"(または"リード")を改変して、"ヒット"が活性を調節する能力を最適化することができる。

【0097】

本発明により企図される他の候補阻害剤を設計することができ、これには溶解性型の結合パートナー、ならびにキメラ、または融合蛋白質等の結合パートナーが含まれる。本明細書において用いる場合、"結合パートナー"は、上述したような天然の結合パートナーならびにキメラポリペプチド、天然のリガンド以外のペプチド調節剤、抗体、抗体フラグメント、および同定されたホスファターゼ遺伝子の発現産物に免疫特異的な抗体ドメインを含む改変型化合物を広く包含する。

【0098】

ホスファターゼポリペプチドの特異的ペプチドリガンドを同定するために他のアッセイを用いることができ、これには、試験リガンドの標的蛋白質への直接結合の測定により標的蛋白質のリガンドを同定するアッセイ、ならびにイオンスプレー質量分析計/ HPLC方法を用いてアフィニティー限外濾過により標的蛋白質のリガンドを同定するアッセイ、または他の物理学的小および分析的方法が含まれる。あるいは、そのような結合相互作用は、Fields et al., Nature, 340:245-246(1989)、およびFields et al., Trends in Genetics, 10:286-292(1994)(いずれも本明細書の一部としてここに引用する)に記載される酵母ツーハイブリッド系を用いて間接的に評価することができる。ツーハイブリッド系は2つの蛋白質またはポリペプチドの間の相互作用を検出するための遺伝子アッ

セイである。これを用いて、目的とする既知の蛋白質または線引きされたドメインまたは相互作用に重要な残基に結合する蛋白質を同定することができる。この方法論の変形が、DNA結合蛋白質をコードする遺伝子のクローニング、蛋白質に結合するペプチドの同定、および薬剤のスクリーニング用に開発されている。ツ-ハイブリッド系は、1対の相互作用する蛋白質が転写活性化ドメインをレポーター遺伝子上流活性化配列(UAS)に結合するDNA結合ドメインの近くに配置させる能力を利用しており、一般に酵母において行われる。アッセイにおいては、(1)第1の蛋白質に融合されたDNA結合ドメイン、および(2)第2の蛋白質に融合された活性化ドメイン、をコードする2つのハイブリッド遺伝子を構築することが必要である。DNA結合ドメインは、第1のハイブリッド蛋白質をレポーター遺伝子のUASにターゲティングする。しかし、ほとんどの蛋白質は活性化ドメインを有していないため、このDNA結合ハイブリッド蛋白質はレポーター遺伝子の転写を活性化しない。活性化ドメインを含む第2のハイブリッド蛋白質は、UASに結合しないため、それ自身ではレポーター遺伝子の発現を活性化しない。しかし、両方のハイブリッド蛋白質が存在する場合には、第1の蛋白質と第2の蛋白質との非共有結合的相互作用が活性化ドメインをUASにつなぎ、レポーター遺伝子の転写を活性化させる。例えば、第1の蛋白質が、他の蛋白質または核酸と相互作用することが知られているホスファターゼ遺伝子産物、またはそのフラグメントである場合、このアッセイを用いて結合相互作用に干渉する薬剤を検出することができる。異なる試験薬剤を系に添加してレポーター遺伝子の発現をモニターする。阻害剤が存在すると、レポーターシグナルが発生しない。

【0099】

ホスファターゼポリペプチド遺伝子産物の機能が未知であり、遺伝子産物に結合するリガンドが知られていない場合においても、酵母ツ-ハイブリッドアッセイを用いて遺伝子産物に結合する蛋白質を同定することができる。ホスファターゼポリペプチドまたはそのフラグメントに結合する蛋白質を同定するアッセイにおいては、ホスファターゼポリペプチド(またはフラグメント)およびUAS結合ドメイン(すなわち、第1の蛋白質)の両方をコードする融合ポリヌクレオチ

ドを用いることができる。さらに、それぞれが活性化ドメインに融合された異なる第2の蛋白質をコードする多数のハイブリッド遺伝子を製造し、アッセイにおいてスクリーニングすることができる。典型的には、第2の蛋白質は総cDNAまたはゲノムDNA融合ライブラリの1またはそれ以上のメンバーによりコードされ、ここで、それぞれの第2の蛋白質のコーディング領域は活性化ドメインに融合されている。この系は広範な種類の蛋白質に適用することができ、第2の結合蛋白質の同一性または機能を知ることすら必要ではない。この系は非常に感度が高く、他の方法では明らかにされない相互作用を検出することができる。過渡的相互作用であっても、転写を誘発して安定なmRNAを生成し、これは繰り返し翻訳されてレポーター蛋白質を生成することができる。

【0100】

他のアッセイを用いて、標的蛋白質に結合する薬剤を検索してもよい。試験リガンドの標的蛋白質への直接結合を同定する1つのそのようなスクリーニング方法が、米国特許5,585,277(本明細書の一部としてここに引用する)に議論されている。この方法は、蛋白質は一般に折り畳まれた状態と折り畳まれていない状態の混合物として存在し、2つの状態の間で継続的に交替しているという原理に基づく。試験リガンドが折り畳まれた形の標的蛋白質に結合する場合(すなわち、試験リガンドが標的蛋白質のリガンドである場合)、リガンドに結合した標的蛋白質分子は折り畳まれた状態のままである。すなわち、折り畳まれた標的蛋白質は、標的蛋白質に結合する試験リガンドの存在下で、リガンドの非存在下におけるよりも多く存在する。リガンドの標的蛋白質への結合は、折り畳まれた状態と折り畳まれていない状態の標的蛋白質とを区別する任意の方法により検出することができる。このアッセイを行うためには、標的蛋白質の機能がわかっている必要はない。この方法により事実上すべての薬剤、例えば、限定されないが、金属、ポリペプチド、蛋白質、脂質、多糖類、ポリヌクレオチドおよび小有機分子を試験リガンドとして評価することができる。

【0101】

標的蛋白質のリガンドを同定する別の方法は、Wieboldt et al., Anal. Chem., 69:1683-1691(1997)(本明細書

の一部としてここに引用する)に記載されている。この手法は、1回に溶液相中の20-30種類の薬剤のコンビナトリアルライブラリを標的蛋白質に対する結合についてスクリーニングする。簡単な膜洗浄により標的蛋白質に結合する薬剤を他のライブラリ成分から分離する。次にフィルター上に保持された特定の選択された分子を標的蛋白質から遊離させ、HPLCおよび気体補助エレクトロスプレー(イオンスプレー)イオン化質量分析により分析する。この方法は、標的蛋白質に対して最も高い親和性を有するライブラリ成分を選択し、特に小分子ライブラリについて有用である。

【0102】

本発明の好ましい態様においては、ホスファターゼ活性を調節する化合物をスクリーニングする方法は、試験化合物をホスファターゼポリペプチドと接触させ、化合物とホスファターゼポリペプチドとの間の複合体の存在についてアッセイすることを含む。そのようなアッセイにおいては、典型的にはリガンドを標識する。適当にインキュベートした後、遊離のリガンドを結合した形のリガンドから分離する。遊離のまたは複合体を形成していない標識の量は、特定の化合物がホスファターゼポリペプチドに結合する能力の尺度である。

【0103】

本発明の別の態様においては、ホスファターゼポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物のハイスループットスクリーニングを用いる。簡単には、多数の様々な小ペプチド試験化合物を固体支持体上で合成する。ペプチド試験化合物をホスファターゼポリペプチドと接触させ、洗浄する。次に、結合したホスファターゼポリペプチドを当該技術分野においてよく知られる方法により検出する。精製した本発明のポリペプチドを、上述した薬剤スクリーニング手法において用いるために、直接プレート上にコーティングすることもできる。さらに、非中和抗体を用いて蛋白質を捕獲し、これを固体支持体上に固定化することができる。

【0104】

本発明の別の態様は、本発明のポリペプチドに結合しうる中和抗体がポリペプチドに対する結合について試験化合物と特異的に競合する、競合スクリーニング

アッセイを用いることを含む。このようにして、抗体を用いて、ホスファターゼポリペプチドと1またはそれ以上の抗原性決定基を共有するペプチドの存在を検出することができる。放射性標識した競合結合実験は、A. H. Lin et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997, vol. 41, no. 10. pp. 2127-2131に記載されており、この開示はその全体を本明細書の一部としてここに引用する。

【0105】

別の観点においては、本発明は、治療を必要とする患者に、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるホスファターゼの活性を調節する物質を投与することにより疾病を治療する方法を提供する。好ましくは疾病は、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳またはニューロン関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には、これらの疾病には、組織、または造血細胞起源の癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態、例えば、片頭痛、痛み、性的機能不全、気分障害、注意障害、認識障害、低血圧症、および高血圧症；精神病性および神経学的疾患、例えば、不安、精神分裂病、躁うつ病、せん妄、痴呆、重症の精神遅滞および運動異常症、例えば、ハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患、例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、および筋萎縮性側方硬化症；HIV-1、HIV-2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患、例えば糖尿病および肥満、およびこれらに関連する症候群、特に、心臓血管疾患、例えば、再灌流再狭窄、冠状動脈血栓症、凝固疾患、制御されない細胞成長疾患、アテローム性動脈硬化症；眼性疾患、例えば緑内障、網膜症、および黄斑変性；炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、慢性炎症性腸疾病、慢性炎症性骨盤疾病、多発性硬化症、ぜん息、変形性関節症、乾癬、アテローム性動脈硬化症、鼻炎、自己免疫、および臓器移植拒絶が含まれる。

【0106】

好ましい態様においては、本発明は、治療を必要とする患者に、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドの活性を調節する物質を投与することにより、疾病または疾患を治療または予防する方法を提供する。好ましくは、疾病は、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳またはニューロン関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には、これらの疾病には、組織、または造血細胞起源の癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態、例えば、片頭痛、痛み、性的機能不全、気分障害、注意障害、認識障害、低血圧症、および高血圧症；精神病性および神経学的疾患、例えば、不安、精神分裂病；躁うつ病、せん妄、痴呆、重症の精神遅滞および運動異常症、例えば、ハンチントン病、またはツレット症候群；神経変性性疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、および筋萎縮性側方硬化症；HIV-1、HIV-2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患、例えば、糖尿病および肥満、およびこれらに関連する症候群、特に、心臓血管疾患、例えば、再灌流再狭窄、冠状動脈血栓症、凝固疾患、制御されない細胞成長疾患、アテローム性動脈硬化症；眼性疾患、例えば、緑内障、網膜症、および黄斑変性；炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、慢性炎症性腸疾病、慢性炎症性骨盤疾病、多発性硬化症、ぜん息、変形性関節症、乾癬、アテローム性動脈硬化症、鼻炎、自己免疫、および臓器移植拒絶が含まれる。

【0107】

本発明はまた、治療を必要とする患者に、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドの活性を調節する物質を投与することにより、疾病または疾患を治療または予防する方法を特徴とする。好ましくは、疾病は、癌、免疫関連

疾病および疾患，心臓血管疾病，脳またはニューロン関連疾病，および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には，これらの疾病には，組織，または造血細胞起源の癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態，例えば，片頭痛，痛み，性的機能不全，気分障害，注意障害，認識障害，低血圧症，および高血圧症；精神病性および神経学的疾患，例えば不安，精神分裂病，躁うつ病，せん妄，痴呆，重症の精神遅滞および運動異常症，例えばハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患，例えばアルツハイマー病，パーキンソン病，多発性硬化症，および筋萎縮性側方硬化症；H I V - 1，H I V - 2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患，例えば糖尿病および肥満およびこれらに関連する症候群，特に，心臓血管疾患，例えば再灌流再狭窄，冠状動脈血栓症，凝固疾患，制御されない細胞成長疾患，アテローム性動脈硬化症；眼性疾患，例えば緑内障，網膜症，および黄斑変性；炎症性疾患，例えば慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶が含まれる。

【0108】

本発明はまた，治療を必要とする患者に，配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24に記載される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドの活性を調節する物質を投与することにより，疾病または疾患を治療または予防する方法を特徴とする。好ましくは，疾病は，免疫関連疾病および疾患，心臓血管疾病，および癌からなる群より選択される。最も好ましくは，免疫関連疾病および疾患は，慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植からなる群より選択される。

【0109】

ホスファターゼ関連疾患または疾病の治療に有用な物質は，好ましくは，問題

とする疾病または疾患の治療に対応する活性についての1またはそれ以上のインビトロアッセイにおいて陽性の結果を示す(そのようなアッセイの例は、本明細書において提供され参照される。望ましい活性についてスクリーニングすることができる物質の例は、以下に提供され参照される。ホスファターゼの活性を調節する物質は、好ましくは、限定されないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび以下に参照される方法およびスクリーニングにより決定されるような蛋白質ホスファターゼの阻害剤を含む。

【0110】

"予防する"との用語は、生物が異常な状態に罹患するかこれを発達させる可能性を減少させることを表す。

【0111】

"治療する"との用語は、生物において治療効果を有し、異常な状態を少なくとも部分的に緩和するかまたは排除することを表す。

【0112】

"治療効果"との用語は、異常な状態を引き起こすかまたはこれに寄与する阻害または活性化率を表す。治療効果は、異常な状態の1またはそれ以上の症状をある程度緩和する。異常な状態の治療に関して、治療効果は、以下の1またはそれ以上を表すことができる：(a)細胞の増殖、成長、および/または分化の増加；(b)細胞死の阻害(すなわち、遅延または停止)；(c)変性の阻害；(d)異常な状態に伴う1またはそれ以上の症状のある程度の緩和；および(e)影響を受けた細胞の集団の機能の増強。異常な状態に対して有効性を示す化合物は、本明細書に記載されるようにして同定することができる。

【0113】

"異常な状態"との用語は、生物の細胞または組織における、その生物における正常な機能からはずれた機能を表す。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、または細胞生存に関連する。

【0114】

異常な細胞増殖状態には、癌、例えば繊維性およびメサンギウム疾患、異常な新脈管形成および脈管形成、創傷治癒、乾癬、真性糖尿病、および炎症が含まれ

る。

【0115】

異常な分化状態には、限定されないが、神経変性疾患、遅い創傷治癒速度、および遅い組織移植治癒速度が含まれる。

【0116】

異常な細胞生存状態は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）経路が活性化されているかまたは排除されている状態に関連する。多くの蛋白質ホスファターゼがアポトーシス経路に関連している。蛋白質ホスファターゼのいずれかの機能の異常は、細胞の不死または未成熟細胞死につながりうる。

【0117】

シグナル伝達プロセスにおけるホスファターゼの機能に関連して、“異常な”との用語は、生物において過剰発現または過小発現されているか、その触媒活性が野生型蛋白質ホスファターゼ活性より低いかまたは高いように変異しているか、天然の結合パートナーともはや相互作用できないように変異しているか、別の蛋白質ホスファターゼまたは蛋白質ホスファターゼによりもはや修飾されないか、または天然の結合パートナーともはや相互作用しない、ホスファターゼを表す。

【0118】

“投与する”との用語は、化合物を生物の細胞または組織内に取り込ませる方法に関連する。異常な状態は、生物の細胞または組織が生物中または生物外に存在する場合、予防または治療することができる。生物の外に存在する細胞は、細胞培養皿中で維持または成長させることができる。生物中に含まれる細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多くの手法が存在し、例えば、限定されないが、経口、非経口、経皮、注入およびエアロゾル外用が含まれる。生物外の細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多数の手法が存在し、例えば、限定されないが、細胞マイクロインジェクション手法、トランスフォーメーション手法、および担体手法が含まれる。

【0119】

異常な状態はまた、シグナル伝達経路に異常を有する一群の細胞を有する生物に化合物を投与することにより、予防または治療することができる。次に、化合

物の投与が生物機能に及ぼす影響をモニターすることができる。生物は、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、またはヤギであり、より好ましくは有尾サルまたは無尾サルであり、最も好ましくはヒトである。

【0120】

別の観点においては、本発明は、疾病または疾患の診断道具として、試料中においてホスファターゼポリペプチドを検出する方法を特徴とする。該方法は、(a) 試料を、ハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するホスファターゼポリペプチドの核酸標的領域にハイブリダイズする核酸プローブと接触させ、ここで、前記プローブは、ポリペプチド、そのフラグメントをコードする核酸配列、および配列およびフラグメントの相補体を含み；そして(b) プローブ：標的領域ハイブリッドの存在または量を疾病の指標として検出する、の各工程を含む。

【0121】

本発明の好ましい態様においては、疾病または疾患は、慢性関節リウマチ、動脈硬化症、自己免疫疾患、臓器移植、心筋梗塞、心筋症、発作、腎不全、酸化的ストレス関連神経変性性疾患、および癌からなる群より選択される。

【0122】

ホスファターゼ"標的領域"とは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12に記載される配列からなる群より選択されるヌクレオチド塩基配列、または核酸プローブが特異的にハイブリダイズするであろう対応する全長配列、その機能的誘導体、またはそのフラグメントである。特異的なハイブリダイゼーションとは、他の核酸の存在下において、プローブが本発明のホスファターゼの標的領域にのみ検出可能なようにハイブリダイズすることを示す。予測標的領域は、当該技術分野においてよく知られる、デ

ータベース中の最も近い関連配列のアラインメントおよび比較からなる方法により同定することができる。

【0123】

好ましい態様においては、核酸プローブは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列、または対応する全長アミノ酸配列またはそれらの機能的誘導体からなる群より選択される配列の、少なくとも6、12、75、90、105、120、150、200、250、300または350個の連続するアミノ酸をコードするホスファターゼ標的領域にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件は、他の核酸分子の存在下でホスファターゼ遺伝子とのみハイブリダイゼーションが生ずるような条件であるべきである。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下では、高度に相補的な核酸配列のみがハイブリダイズする。好ましくは、そのような条件は、20個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。そのような条件は上で定義される。

【0124】

試料中のホスファターゼ遺伝子の検出により診断することができる疾病には、ホスファターゼ核酸(DNAおよび/またはRNA)が正常細胞と比較して増幅されている疾病が含まれる。"増幅"とは、正常細胞と比較して、細胞中でホスファターゼDNAまたはRNAの数が増加していることを意味する。正常細胞においては、ホスファターゼは典型的には1コピーの遺伝子として見いだされる。選択された疾病においては、ホスファターゼ遺伝子の染色体位置が増幅されて、遺伝子の多数のコピーまたは増幅が生ずる。遺伝子増幅は、そのようなホスファターゼRNAを増幅させることができ、またはホスファターゼRNAはホスファターゼDNAの増幅なしに増幅することができる。

【0125】

RNAに関する場合、"増幅"は、細胞においてホスファターゼRNAが検出可能なように存在することでありうる。ある正常細胞においては、ホスファターゼ

RNAの基底発現がないためである。他の正常細胞においては、ホスファターゼの発現の基底レベルが存在し、したがってこれらの場合には増幅は基底レベルと比較して少なくとも1 - 2倍、好ましくはそれより多い、ホスファターゼRNAの検出である。

【0126】

試料中のホスファターゼ核酸の検出により診断することができる疾病には、好ましくは癌が含まれる。本発明の核酸探索方法に適した試験試料には、例えば、細胞または細胞の核酸抽出物、または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は、アッセイフォーマット、検出方法、およびアッセイする組織、細胞または抽出物の性質により様々でありうる。細胞の核酸抽出物を調製する方法は当該技術分野においてよく知られており、用いる方法に適合した試料を得るために容易に適合させることができる。

【0127】

別の観点においては、本発明は、疾病または疾患の診断道具として、試料中のホスファターゼポリペプチドを検出する方法を特徴とする。該方法は、(a) 試料中のホスファターゼポリペプチドをコードする核酸標的領域を、ホスファターゼポリペプチド、またはその1またはそれ以上フラグメントをコードする対照核酸標的領域と比較し、ここで、ホスファターゼポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載される配列、またはその1またはそれ以上フラグメントからなる群より選択されるアミノ酸配列を有しており；そして(b) 標的領域と対照標的領域との間の配列または量の相違を疾病または疾患の指標として検出することを含む。好ましくは、疾病は、癌、免疫関連疾病および疾患、心臓血管疾病、脳またはニューロン関連疾病、および代謝性疾患からなる群より選択される。より詳細には、これらの疾病には、組織、または造血細胞起源の癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態、例えば、片頭痛、痛み、性的機能不全、気分障害、注意障害、認識障害、低血圧症、および高血圧症；精神病性および神経学的疾患、例えば、不安、精神分裂病、躁うつ病、せん妄、痴呆、重症の精神遅滞お

よび運動異常症，例えば，ハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患，例えば，アルツハイマー病，パーキンソン病，多発性硬化症，および筋萎縮性側方硬化症；H I V - 1 ， H I V - 2 または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患，例えば糖尿病および肥満，およびこれらに関連する症候群，特に，心臓血管疾患，例えば，再灌流再狭窄，冠状動脈血栓症，凝固疾患，制御されない細胞成長疾患，アテローム性動脈硬化症；眼性疾患，例えば，緑内障，網膜症，および黄斑変性；炎症性疾患，例えば，慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶が含まれる。

【0128】

本明細書において用いる場合，"比較する"との用語は，試料から単離された核酸標的領域と対照核酸標的領域との間の不一致を同定することを表す。不一致は，ヌクレオチド配列における，例えば挿入，欠失，または点突然変異であってもよく，または所定のヌクレオチド配列の量におけるものであってもよい。配列におけるこれらの不一致を判定する方法は当業者にはよく知られている。"対照"核酸標的領域とは，正常細胞，例えば，先に記載したような疾病を有しない細胞において見いだされる配列または配列の量を表す。

【0129】

使用方法

ヒト蛋白質ホスファターゼの部分アミノ酸配列は，配列番号1，配列番号2，配列番号3，配列番号4，配列番号5，配列番号6，配列番号7，配列番号8，配列番号9，配列番号10，配列番号11，および配列番号12に記載される核酸配列によりコードされる。

【0130】

これらの配列は，推定される蛋白質ホスファターゼのそれぞれの全長クローンを見いだすために用いられる。これらのクローンは，コードされる蛋白質ホスファターゼの触媒活性を阻害し，以下の疾病の治療に潜在的有用性を有する小分子化合物のスクリーニングに有用であろう：組織または血液の癌，例えば，乳，結

腸，肺，前立腺，子宮頸部，脳，卵巣，膀胱または腎臓の癌；中枢神経または末梢神経系疾病および状態，例えば，片頭痛，痛み，性的機能不全，気分障害，注意障害，認識障害，低血圧症，および高血圧症；精神病性および神経学的疾患，例えば不安，精神分裂病，躁うつ病，せん妄，痴呆，重症の精神遅滞および運動異常症，例えばハンチントン病またはツレット症候群；神経変性性疾患，例えばアルツハイマー病，パーキンソン病，多発性硬化症，および筋萎縮性側方硬化症；HIV-1，HIV-2または他のウイルスまたはプリオン体または真菌または細菌生物により引き起こされるウイルスまたは非ウイルス感染；代謝性疾患，例えば糖尿病および肥満およびこれらに関連する症候群，特に，心臓血管疾患，例えば再灌流再狭窄，冠状動脈血栓症，凝固疾患，制御されない細胞成長疾患，アテローム性動脈硬化症；眼性疾患，例えば緑内障，網膜症，および黄斑変性；炎症性疾患，例えば慢性関節リウマチ，慢性炎症性腸疾病，慢性炎症性骨盤疾病，多発性硬化症，ぜん息，変形性関節症，乾癬，アテローム性動脈硬化症，鼻炎，自己免疫，および臓器移植拒絶。

【0131】

上述した本発明の概要は限定的なものではなく，本発明の他の特徴および利点は，以下の本発明の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

【0132】

図面の簡単な説明

図1A-Hは，ヒト蛋白質ホスファターゼのヌクレオチド配列を示す（配列番号1，配列番号2，配列番号3，配列番号4，配列番号5，配列番号6，配列番号7，配列番号8，配列番号9，配列番号10，配列番号11，および配列番号12）。

【0133】

図2A-2Cは，配列番号1-配列番号12によりコードされるヒト蛋白質ホスファターゼのアミノ酸配列を提供する（それぞれ配列番号13，配列番号14，配列番号15，配列番号16，配列番号17，配列番号18，配列番号19，配列番号20，配列番号21，配列番号22，配列番号23，および配列番号24）。いくつかの配列はコーディング領域中で推定終止コドンにコードしており

, これは ' x ' で示される。

【0134】

発明の詳細な説明

本発明は、新規なポリペプチド、これらのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の単離および特徴付け、種々のポリペプチド関連疾病および状態、例えば癌の診断および治療に有用な化合物を同定するのに用いることができる種々の産物およびアッセイ方法に関する。ポリペプチド、好ましくはホスファターゼ、およびそのようなポリペプチドをコードする核酸は、本明細書に記載される配列が与えられれば、よく知られる標準的な合成手法を用いて製造することができる。以下の表1-8を参照すると、本発明の遺伝子をより理解することができる。本発明はさらに、多数の異なる態様、例えば以下に記載される態様を提供する。

【0135】

核酸

マップされた遺伝子の染色体の位置と癌における関与が示唆されているアンプリコンとの関連づけは、文献検索 ([PubMed http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)), OMI M検索 ([Online Mendelian Inheritance in Man, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html)) および Knuutila, et al. により維持されている癌アンプリコンの包括的データベース ([Knuutila, et al., DNA copy number amplifications in human neoplasms. Review of comparative genome hybridization studies. Am J Pathol 152:1107-1123, 1998. http://www.helsinki.fi/~lelwww/CMG.html](http://www.helsinki.fi/~lelwww/CMG.html)) に基づく。マップされた遺伝子の多くについて、Knuutilaからの細胞遺伝学的領域が示されており、続いて、増幅が報告されている事例の数および調べた事例の総数が示されている。すなわち、以下のSGP006については、登録物"膀胱癌腫(12q21-q24, 1/16)"とは、染色体位置の12q21-q24

が非小細胞肺癌に関連づけられており、これは、SGP006の位置を包含し、調べた16例の試料中の1例で増幅が認められたことを意味する。

【0136】

一塩基多型については、NCBIで維持されているdbSNP（一塩基多型のデータベース）（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>）においてSNPが記録されている場合に、受託番号（例えば、SGK187についてはss1581624）が与えられる。SNPについての受託番号を用いて、このサイトから完全SNP含有配列を引き出すことができる。dbSNP受託番号を有しない候補SNPsは、本明細書の配列のcDNAおよびゲノムデータベースに対するBlastn出力を調べることにより同定した。これは、例えば、表7および8に示され、実施例1において記載される。

【0137】

核酸プローブ、ホスファターゼを検出するための方法およびキット

本発明はさらに、核酸プローブおよびその用途を提供する。本発明の核酸プローブを用いて、通常のハイブリダイゼーション方法により適当な染色体またはcDNAライブラリを探索して、本発明の他の核酸分子を得ることができる。染色体DNAまたはcDNAライブラリは、当該技術分野において認識されている方法にしたがって、適当な細胞から調製することができる（"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 第2版. Cold Spring Harbor Laboratory, Sambrook, Fritsch, & Maniatis, eds., 1989を参照）。

【0138】

別の方法においては、目的とするポリペプチドのアミノ酸配列のN末端、およびC末端部分に対応するヌクレオチド配列を有する核酸プローブを得るために化学合成を行うことができる。合成した核酸プローブを、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）においてプライマーとして使用して、認識されているPCR手法にしたがって、本質的にPCR Protocols, "A Guide to Methods and Applications", Academic Pre

ss, Michael, et al., eds., 1990にしたがって, 適当な染色体またはcDNAライブラリを用いて, 本発明のフラグメントを得ることができる。

【0139】

当業者は, 本明細書に開示される配列に基づいて, 当該技術分野において知られるコンピュータアラインメントおよび配列分析の方法を用いて, そのようなプローブを容易に設計することができる("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 上掲)。本発明のハイブリダイゼーションプローブは, 標準的な標識技術, 例えば放射性標識, 酵素標識, 蛍光標識, ビオチン-アビジン標識, 化学発光等を用いる技術により, 標識することができる。ハイブリダイゼーション後, プローブは既知の方法を用いて可視化することができる。

【0140】

本発明の核酸プローブはRNAならびにDNAプローブを含み, そのようなプローブは, 例えば当該技術分野において知られる技術を用いて生成される。核酸プローブは, 固体支持体上に固定化してもよい。そのような固体支持体の例としては, 限定されないが, プラスチック, 例えばポリカーボネート, 複合炭水化物, 例えばアガロースおよびセファロース, およびアクリル樹脂, 例えばポリアクリルアミドおよびラテックスビーズが含まれる。核酸プローブをそのような固体支持体に結合させる技術は当該技術分野においてよく知られている。

【0141】

本発明の核酸探索方法に適した試験試料には, 例えば, 細胞または細胞の核酸抽出物, または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は, アッセイフォーマット, 検出方法, およびアッセイすべき組織, 細胞, または抽出物の性質により様々であろう。細胞の核酸抽出物を調製する方法は当該技術分野においてよく知られており, 用いる方法に適合する試料を得るために容易に適合させることができる。

【0142】

試料中で本発明の核酸の存在を検出する1つの方法は, (a) 前記試料をハイ

ブリダイゼーションが生ずるような条件下で上述の核酸プローブと接触させ、そして(b)前記核酸分子に結合した前記プローブの存在を検出する、ことを含む。当業者は、当該技術分野において知られる技術にしたがって、上述のように核酸プローブを選択するであろう。試験すべき試料には、限定されないが、ヒト組織のRNA試料が含まれる。

【0143】

試料中で本発明の核酸の存在を検出するためのキットは、その中に上述の核酸プローブが置かれている少なくとも1つの容器手段を含む。キットはさらに、以下の1またはそれ以上を含む他の容器を含んでいてもよい：洗浄試薬および結合した核酸プローブの存在を検出することができる試薬。検出試薬の例としては、限定されないが、放射性標識プローブ、酵素標識プローブ（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ）、および親和性標識プローブ（ビオチン、アビジン、またはストレプトアビジン）が挙げられる。好ましくは、キットはさらに使用の指針を含む。

【0144】

詳細には、コンパートメント化されたキットには、試薬が別々の容器に入れている任意のキットが含まれる。そのような容器には、小ガラス容器、プラスチック容器またはプラスチックまたは紙のストリップが含まれる。そのような容器は、試料および試薬が互いに夾雑しないように、かつ各容器の薬剤または溶液を定量的様式で1つのコンパートメントから別のコンパートメントに加えることができるように、1つのコンパートメントから別のコンパートメントに試薬を有効に移すことができるものである。そのような容器には、試験試料を入れる容器、アッセイにおいて用いるプローブまたはプライマーを含有する容器、洗浄試薬（例えばリン酸緩衝化食塩水、Tris緩衝液等）を含有する容器、およびハイブリダイズしたプローブ、結合した抗体、増幅産物等を検出するために用いられる試薬を含有する容器が含まれる。当業者は、本発明において記載される核酸プローブを、当該技術分野においてよく知られる確立されたキットフォーマットの1つに容易に組み込むことができることを容易に認識するであろう。

【0145】

本発明にしたがうポリペプチドの分類

本発明の多数の蛋白質ホスファターゼについて、これが属する蛋白質クラスおよびファミリーの分類、非触媒的蛋白質モチーフの概要、ならびに染色体位置が提供される。この情報は、各蛋白質についての機能、制御および/または治療的有用性を決定するのに有用である。染色体領域の増幅を種々の癌と関連づけることができる。本明細書において議論されるアンプリコンについては、情報源はKnuutila, et al (Knuutila S, Bjorkqvist A-M, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius V-M, Vidgren V & Zhu Y: DNA copy number amplifications in human neoplasms. Review of comparative genome hybridization studies. Am J Pathol 152:1107-1123, 1998. http://www.helsinki.fi/~lgll_www/CMG.html)であった。

【0146】

ホスファターゼ分類および蛋白質ドメインは、しばしば、経路、細胞での役割、または上流または下流の制御のメカニズムを反映する。また、疾病関連性遺伝子は、しばしば関連する遺伝子のファミリーにおいて生ずる。例えば、ホスファターゼファミリーの1つのメンバーがオンコジンはまたは腫瘍抑制剤として機能する場合、または、免疫、神経、心臓血管、または代謝性疾患において破壊されていることが見いだされている場合、他のファミリーメンバーはしばしば関連する役割を果たすであろう。

【0147】

染色体位置は、腫瘍アンプリコンまたは腫瘍抑制剤遺伝子座についての候補標的を同定することができる。有力な腫瘍アンプリコンの概要は文献から入手可能であり、隣接する領域に位置するホスファターゼ遺伝子の増幅されたコピーを含むことを実験的に確認すべき腫瘍タイプを同定することができる。

【0148】

本発明のポリペプチドのより詳細な特性決定，例えば潜在的な生物学的および臨床的意味は，例えば実施例2および3に提供される。

【0149】

ホスファターゼ活性を示すポリペプチドの分類

本明細書に記載されるポリペプチドは，以下のグループのいずれかに属することができる：(1)蛋白質ホスファターゼの二重特異性グループ(DSP)；(2)セリン-トレオニンホスファターゼ(STP)；または(3)蛋白質チロシンホスファターゼ(PTP)。この分類は，少なくとも部分的には，このクラスホスファターゼの触媒ドメインを構築している保存されたコアアミノ酸配列モチーフによる。

【0150】

DSPグループ

二重特異性クラスのホスファターゼの触媒ドメインの独特の特徴的モチーフはこれらの酵素がホスホセリン/ホスホトレオニン，ならびにホスホチロシン残基を脱リン酸化する能力を担う。蛋白質ホスファターゼの二重特異性グループには，MAPキナーゼホスファターゼ(MKP)のファミリーメンバーが含まれる。MKPファミリーの構造的および機能的特徴は以下に記載される。

【0151】

MKPファミリー

本明細書に記載される新規MKP様ホスファターゼは，SGP006(配列番号1)，SGP002(配列番号2)，SGP001(配列番号3)，SGP018(配列番号4)，SGP003(配列番号5)，SGP014(配列番号6)，SGP060(配列番号7)，およびSGP008(配列番号8)を含み，これらは例えば表1-6および実施例2により詳細に開示される。

【0152】

二重特異性ホスファターゼファミリーには，約20個の既知のヒトメンバーが含まれる(一覧については，http://smart.emblheidelberg.de/smart/get_members.pl?WHAT=sp

e c i e s & N A M E = D S P c & W H I C H = H o m o _ _ s a p i e n s を参照)。二重特異性ホスファターゼのMPKファミリーのよく知られるメンバーには以下のものが含まれる：DUS1 (MPK-1, CL100, PTPN-10, erp, VH1または3CH134としても知られる), DUS3 (VHRとしても知られる), DUS4 (HVH2, TYP1, MKP2またはVH2としても知られる), DUS5 (HVH3, B23, VH3としても知られる), DUS6 (PYST1, MKP3, rVH6としても知られる), DUS7 (PYST2としても知られる), CDKN3 (CDKN3, KAP, CIP2またはCDI1としても知られる), VH5およびSTYX。

【0153】

ほとんどのMKPホスファターゼは、脱リン酸化反応により、MAPK経路に関与するキナーゼを不活性化することができる。ERK (細胞外シグナル制御キナーゼ), JNK/SAPK (c-JunN末端キナーゼ/ストレス活性化蛋白質キナーゼ) およびp38MAPキナーゼ経路は、細胞外リガンドに応答して、細胞分裂、分化またはアポトーシスを担うシグナル伝達事象を媒介する (Cobb MH, Prog Biophys Mol Biol. 1999; 71 (3-4): 479-500)。完全なMAPキナーゼ酵素活性には、選択的上流二重特異性キナーゼによる、MAPキナーゼの活性ループに存在するトレオニンおよびチロシン残基の同時リン酸化が必要である。MKPファミリー二重特異性ホスファターゼは、これらのトレオニンおよびチロシン残基を脱リン酸化することによりMAPキナーゼの活性を媒介する。このメカニズムは、MAPキナーゼ経路の負のフィードバック制御を提供する。MKPは、細胞トランスフォーメーションに関与するMAPキナーゼカスケードを弱体化させることにより、ヒト癌において重要な役割を果たすかもしれない。

【0154】

多数のMAPキナーゼ、ならびにMKPが存在するが、中心となる疑問は、MKPによるキナーゼ基質認識において選択性が存在するか否かである。そのような特異性が存在するという証拠は、DUS-6 (MKP3) およびVH5により提供される。これらは、それぞれERKまたはJNK/SAPKおよびp38M

MAPキナーゼに対して高度に選択的なホスファターゼであることが示されている (Muda M, et al., J Biol Chem. 1996 Nov 1; 271(44): 27205-8.)。別のレベルの基質特異性は, DUS-6 (MKP3) により示されるように, 細胞内コンパートメント化により生ずる。これは, 核ではなく細胞質においてのみ見いだされる (Groom, L. A. et al (1996) EMBO J. 15: 3621-3632)。さらに, 特異性は, 発現の組織特異性のレベルからも生じうる (例えば, Muda, M. et al (1997) J. Biol. Chem. 272: 5141-5151)。

【0155】

MAPキナーゼ対応物の多数のメンバーが酵母 (例えばYVH1), *C. elegans* (例えばY042), ショウジョウバエ (例えばpuckered), 植物 (例えばDsPTP1) および哺乳動物に存在するように, MKPは, 系統発生的分布において普遍的であるようである。多様な種から単離されたMKPの主要な作用モードは, MAPKを脱リン酸化し, このことによりMAPKシグナル伝達経路に負のフィードバックを提供することである。MKPは, 低酸素条件下でMKP-1遺伝子発現が誘導されることから示唆されるように, 病態生理学的低酸素の間に重要な役割を果たしているかもしれない (Laderoute, K. R. (1999) J. Biol. Chem. 274: 12890-12897)。腫瘍の低酸素は, 悪性発達の間の脈管形成の開始に直接連鎖している (Hanahan, D. et al (1996) Cell 86: 353-364 およびMazure, N. M. et al (1996) Cancer Res. 56: 3436-3440)。低酸素状態の間に多くの遺伝子が誘導されることが見いだされている: 例えば熱ショック転写因子-1 (HSF-1) (Benjamin, I. J. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6263-6267), *c-fos* および *c-jun* (Ausserer, W. A. et al (1994) Mol. Cell. Biol. 14: 5032-5042, およびMuller, J. M. (1997) J. Biol. Chem. 272: 23435-23439), および低酸素誘導可能

因子-1 (HIF-1) (Wenger, R. H. et al (1997) J. Biol. Chem. 378:609-616)。MKP-1の転写産物および蛋白質は、初期癌腫、ならびに乳および前立腺癌腫の多くの段階でアップレギュレートされることが示されている (Leav, I. et al (1996) Lab. Invest. 75:361-370)。前立腺腫瘍細胞株におけるMKP-1の過剰発現は、Fasリガンド誘導性アポトーシスに対する耐性を付与し (Srikanth, S. et al. (1999) Mol. Cell. Biochem. 199:169-178)、MKP-1がアポトーシスの阻害に寄与し、アンドロゲン非依存性増殖をもたらすことが示唆されている。MKP-1はまた、抗新生物剤、例えばシスプラチンおよびカンプトテシンにより引き起こされるアポトーシスの誘導を阻害することができる (Sanchez-Perez, I. et al. (2000) Oncogene 19:5142-5152; Costa Pereira, A. P. et al. (2000) Br. J. Cancer 82:1827-1834)。低酸素状態はJNK経路の活性化を介してアポトーシスを誘発し (Ip, Y. T. et al (1998) Curr. Opin. Cell Biol. 10:205-219に概説)、MAPKホスファターゼはこの経路に負のフィードバックを与えることが知られているため、MKP-1はアポトーシスを妨害することにより腫瘍成長を支持することが予測される。MKP-1の過剰発現はコトランスフェクションした腫瘍細胞においてSAPK/JNKの低酸素誘導性活性を妨害する (Laderoute, K. R. (1999) J. Biol. Chem. 274:12890-12897)。

【0156】

MAPKホスファターゼによるERK-1およびERK-2の脱リン酸化および続く不活性化は、アンジオスタチンによる脈管形成性血管内皮細胞増殖の抑制を担うかもしれない (Redlitz, A. et al. (1999) J. Vasc. Res 36:28-34)。

【0157】

本発明に示される新規MPKファミリーホスファターゼは、その主要な機能と

してMAPKシグナル伝達の負のフィードバック制御を有するようであるホスファターゼの、大きくなりつつあるリストに寄与する。既知のMPKの間では基質認識のレベルでの作用メカニズムにおける選択性、細胞内局在および組織分布が知られているため、本明細書に記載される新規MPKは、同様の選択性を示すかもしれない。新規MPKはまた、JNK/SAPK経路を遮断することにより、病因的低酸素症、例えば脈管形成腫瘍において生ずるようなものにおいて、アポトーシスの抑制において役割を果たすかもしれない。抗アポトーシス性MKPを標的とする特異的ホスファターゼ阻害剤の開発は、癌治療の方法として価値を有するであろう。

【0158】

PTPグループ

本発明には、2つのPTP様配列が存在する：SGP012（配列番号11）およびSGP024（配列番号12）であり、これらは例えば表1-6および実施例2により詳細に開示される。

【0159】

SGP012は、ネズミOST-PTP（PTP-ESPとも称される）と密接に関連する。骨精巢PTP（OST-PTP）は、10個のフィブロネクチンタイプIII反復、潜在的膜スパニング領域および2つのタンデム触媒ドメインからなる細胞内ドメインを有する予測レセプター蛋白質チロシンホスファターゼである。発現パターンは非常に限定的であり、主として骨および精巢において検出可能である（Mauro et al. J Biol Chem 1996 269:30659-67）。OST-PTPのリガンドは知られていないが、細胞外ドメインの構造は、細胞-細胞相互作用が関与しているかもしれないことを示唆する。重要なことには、ヒトオルトログはまだクローニングされていない。

【0160】

骨の沈着と吸収のバランスは、2つの細胞タイプ、すなわち、骨芽細胞と破骨細胞との相対的な活性により制御される。骨代謝におけるホスファターゼの潜在的役割は、不完全にしか理解されていない。しかし、骨芽細胞の培養物においては、オルトバナジン酸でPTP活性を阻害するとマトリックス形成が促進される

(Lau et al. *Endocrinology* 188-123:2858-67)。さらに、過剰な吸収を伴う骨疾病を治療するために臨床的に使用されているビスホスホネートは、骨芽細胞の培養物に、骨芽細胞分化、アルカリホスファターゼ活性、タイプIコラーゲン分泌、および鉱化作用等の骨沈着の増加と一致するある範囲の変化を引き起こす(Reinholz et al. *Cancer Research* 2000 60:6001-007)。これらの化合物の分子標的は依然として不明であるが、OST-PTP活性の阻害は、骨芽細胞培養において観察される骨形成活性の増加を担うようである。したがって、OST-PTP活性を標的とすることは、骨粗鬆症、治癒しない骨折、および骨代謝の他の疾患の治療を提供することができる。

【0161】

SGP024はPTP-デルタに関連する部分PTPT触媒ドメインを示す。

【0162】

STPグループ

本発明には、2つのSTP蛋白質が存在する：SGP039（配列番号9）およびSGP040（配列番号10）であり、これらは例えば表1-6および実施例2いより詳細に開示される。

【0163】

セリン-トレオニンホスファターゼは、PP1、PP2A、PP2B、およびPP2Cで表される4つの主要なクラスに分けることができる。PP2aは多制御サブユニットに付随して見いだされ、その不活性化はウイルス成分、例えばモールT抗原によるトランスフォーメーションにつながりうる。制御サブユニットの1つにおける変異は結腸直腸癌に関連づけられており、腫瘍サプレッサーとしての役割と一致する(Takagi et al. *Gut* 2000 47:268-71)。最近、PP2aはTリンパ球の活性化における関与が示唆されている(Chuang et al. *Immunity* 2000 13:313-22)。PP1は、種々の細胞機能、例えば低酸素症に対する応答、アポトーシスおよび細胞質分裂における関与が示唆されている(Taylor et al., *PNAS* 2000 97:12091-96, Aylion et

al. EMBO J 2000 19:2237-46, Orr et al., Infect. Immun. 2000 68:1350-58)。最後に、糖尿病ラットにおける研究は、対照と比較して低下したPP1活性および上昇したPP2A活性を示す(Begum and Ragolia Metabolism 1998 47:54-62)。セリン/トレオニンホスファターゼの活性に及ぼす制御サブユニットの多様性のため、新規メンバーの生物学的機能は予測することが困難である。しかし、研究から、種々の疾病、例えば腫瘍発生、炎症性疾患および代謝性疾患における改良の可能性が示唆される。

【0164】

本発明にしたがう治療方法：

診断：

本発明は、疾病または疾患の診断道具として、試料中のポリペプチドを検出する方法を提供する。該方法は、(a) 試料を、ハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群より選択されるポリペプチドの核酸標的領域にハイブリダイズする核酸プローブと接触させ、前記プローブは、ポリペプチドをコードする核酸配列、そのフラグメント、および配列の相補体およびフラグメントを含み；そして(b) プローブ：標的領域ハイブリッドの存在または量を疾病の指標として検出する、の各工程を含む。

【0165】

本発明の好ましい態様においては、疾病または疾患は、慢性関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、臓器移植、心筋梗塞、心筋症、発作、腎不全、酸化ストレス関連神経変性疾患、代謝性疾患、例えば糖尿病、生殖疾患、例えば不妊症、および癌からなる群より選択される。

【0166】

ハイブリダイゼーション条件は、他の核酸分子の存在下においてその遺伝子とのみハイブリダイゼーションが生ずるような条件であるべきである。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下では、高度に相補的な核酸配列のみがハ

イブリダイズする。好ましくは、そのような条件は、20個の連続するヌクレオチド中に1または2個のミスマッチを有する核酸のハイブリダイゼーションを防止する。そのような条件は上で定義される。

【0167】

試料中の遺伝子の検出により診断することができる疾病には、核酸(DNAおよび/またはRNA)が正常細胞と比較して増幅されている疾病が含まれる。"増幅"とは、正常細胞と比較して、細胞中でDNAまたはRNAの数が増加していることを意味する。

【0168】

RNAに関する場合、"増幅"は、細胞においてRNAが検出可能なように存在することでありうる。ある正常細胞においては、RNAの基底発現がないためである。他の正常細胞においては、発現の基底レベルが存在し、したがってこれらの場合には増幅は基底レベルと比較して少なくとも1-2倍、好ましくはそれより多い検出である。

【0169】

試料中の核酸の検出により診断することができる疾病には、好ましくは、癌が含まれる。本発明の核酸探索方法に適した試験試料には、例えば、細胞または細胞の核酸抽出物、または体液が含まれる。上述の方法において用いられる試料は、アッセイフォーマット、検出方法、およびアッセイする組織、細胞または抽出物の性質により様々でありうる。細胞の核酸抽出物を調製する方法は、当該技術分野においてよく知られており、用いる方法に適合した試料を得るために容易に適合させることができる。

【0170】

抗体、ハイブリドーマ、ホスファターゼの検出のための使用方法およびキット

本発明は、本発明のホスファターゼに対して結合親和性を有する抗体に関する。ポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24に記載されるアミノ酸配列、またはその機能的誘導體、またはその少なくとも9個の連続するアミノ酸(好ま

しくは、その少なくとも20、30、35、または40個の連続するアミノ酸)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有することができる。

【0171】

本発明はまた、本発明のホスファターゼに対して特異的結合親和性を有する抗体に関する。そのような抗体は、本発明のホスファターゼに対するその結合親和性を他のポリペプチドに対する結合親和性と比較することにより単離することができる。本発明のホスファターゼに選択的に結合する抗体を、本発明のホスファターゼと他のポリペプチドとを区別することを必要とする方法において用いるために選択することができる。そのような方法には、限定されないが、他のポリペプチドを含む組織におけるホスファターゼ発現の変化の分析が含まれる。

【0172】

本発明のホスファターゼは、種々の手順および方法、例えば抗体の生成、医薬組成物の同定、およびDNA/蛋白質相互作用の研究において用いることができる。

【0173】

本発明のホスファターゼは、抗体またはハイブリドーマを生成するために用いることができる。当業者は、抗体が望まれる場合、そのようなペプチドを本明細書に記載されるように生成し、免疫原として用いることができることを認識するであろう。本発明の抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにこれらの抗体のフラグメント、およびヒト化型が含まれる。本発明の抗体のヒト化型は、キメラ化またはCDRグラフティング等の当該技術分野において知られる手法の1つを用いて生成することができる。

【0174】

本発明はまた、上述のモノクローナル抗体またはその結合フラグメントを産生するハイブリドーマに関する。ハイブリドーマは、特定のモノクローナル抗体を分泌することができる不死化細胞株である。

【0175】

一般に、モノクローナル抗体およびハイブリドーマを製造する手法は当該技術分野においてよく知られている(Campbell, "Monoclonal A

ntibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1984; St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35:1-21, 1980)。抗体を生成することが知られている任意の動物(マウス,ウサギ等)を,選択されたポリペプチドで免疫することができる。免疫の方法は当該技術分野においてよく知られている。そのような方法には,ポリペプチドの皮下または腹膜内注射が含まれる。当業者は,免疫に用いるポリペプチドの量は,免疫する動物,ポリペプチドの抗原性,および注入部位により様々であることを認識するであろう。

【0176】

ポリペプチドは,ペプチドの抗原性を増加させるために,修飾するかまたはアジュバント中で投与することができる。ポリペプチドの抗原性を増加させる方法は当該技術分野においてよく知られている。そのような方法には,抗原を異種蛋白質(例えばグロブリンまたは -ガラクトシダーゼ)とカップリングさせるか,または免疫の間にアジュバントを含めることが含まれる。

【0177】

モノクローナル抗体については,免疫した動物から脾臓細胞を切除し,ミエロマ細胞,例えばSP2/0-Ag14ミエロマ細胞と融合させ,モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞とさせる。当該技術分野においてよく知られる多数の方法の任意のものを用いて,所望の特性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定することができる。これらには,ハイブリドーマをELISAアッセイ,ウエスタンブロット分析,またはラジオイムノアッセイを用いてスクリーニングすることが含まれる(Lutz et al., Exp. Cell Res. 175:109-124, 1988)。所望の抗体を分泌するハイブリドーマをクローニングし,当該技術分野において知られる方法を用いてクラスおよびサブクラスを決定する(Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniq

ues in Biochemistry and Molecular Biology", 上掲, 1984)。

【0178】

ポリクローナル抗体については、免疫した動物から抗体を含有する抗血清を単離し、上述の方法の1つを用いて所望の特異性を有する抗体の存在についてスクリーニングする。上述の抗体は、検出可能なように標識することができる。抗体は、放射性同位体、アフィニティー標識（例えばビオチン、アビジン等）、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等）、蛍光標識（例えばFITCまたはローダミン等）、常磁性原子等を用いて、検出可能なように標識することができる。そのような標識を行う方法は当該技術分野においてよく知られている。例えば、Stemberger et al., J. Histochem. Cytochem. 18:315, 1970; Bayer et al. Meth. Enzym. 62:308-, 1979; Engval et al., Immunol. 109:129-, 1972; Goding, J. Immunol. Meth. 13:215-, 1976を参照。本発明の標識された抗体は、インビトロ、インビボ、およびインシトゥーアッセイに用いて、特定のペプチドを発現する細胞または組織を同定することができる。

【0179】

上述の抗体は、固体支持体上に固定化してもよい。そのような固体支持体の例には、プラスチック、例えばポリカーボネート、複合炭水化物、例えばアガロースおよびセファロース、アクリル樹脂、例えばポリアクリルアミドおよびラテックスビーズが含まれる。抗体をそのような固体支持体にカップリングさせる技術は当該技術分野においてよく知られている(Weir et al., "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10, 1986; Jacoby et al., Meth. Enzym. 34, Academic Press, N.Y., 1974)。本発明の固定化された抗体は、インビトロ、インビボ、およびインシトゥーアッセイに、ならびに免疫クロマトグラフィーに用

いることができる。

【0180】

さらに、当業者は、合理的に設計された抗ペプチドペプチドを生成するために、現在利用可能な方法、並びに抗体に関して本明細書に記載される技術、方法およびキットを容易に適合させて、特定のペプチド配列に結合しうるペプチドを容易に生成することができる(Hurby et al., "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", In Synthetic Peptides, A User's Guide, W. H. Freeman, NY, pp. 289-307, 1992; Kaspczak et al., Biochemistry 28: 9230-9238, 1989)。

【0181】

抗ペプチドペプチドは、本発明のホスファターゼのペプチド配列中に見いだされる塩基性アミノ酸残基を、疎水性および非荷電極性基を維持しながら酸性残基で置き換えることにより生成することができる。例えば、リジン、アルギニン、および/またはヒスチジン残基をアスパラギン酸またはグルタミン酸で置き換え、およびグルタミン酸残基をリジン、アルギニンまたはヒスチジンで置き換える。

【0182】

本発明はまた、試料中においてホスファターゼポリペプチドを検出する方法を包含する。該方法は、(a) 試料を、免疫複合体が形成するような条件下で上述の抗体と接触させ、そして(b) ポリペプチドに結合した前記抗体の存在を検出する、ことを含む。詳細には、該方法は、試験試料を1またはそれ以上の本発明の抗体とインキュベートし、抗体が試験試料に結合するか否かをアッセイすることを含む。試料中で本発明のホスファターゼのレベルが正常なレベルと比較して変化していることは疾病を示すかもしれない。

【0183】

抗体を試験試料とインキュベートする条件は様々である。インキュベーション条件は、アッセイにおいて用いられるフォーマット、用いられる検出方法、およ

びアッセイにおいて用いられる抗体のタイプおよび性質によって異なる。当業者は、慣用的に入手可能な免疫学的アッセイフォーマット（例えばラジオイムノアッセイ、酵素結合イムノソルベントアッセイ、拡散に基づくオクタロニー、またはロケット免疫蛍光アッセイ）の任意のものを、本発明の抗体を用いるために容易に適合させることができることを認識するであろう。そのようなアッセイの例は、Chard ("An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1986), Bullock et al. ("Techniques in Immunocytochemistry", Academic Press, Orlando, FL Vol. 1, 1982; Vol. 2, 1983; Vol. 3, 1985), Tijssen ("Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1985)に見いだすことができる。

【0184】

本発明の免疫学的アッセイ試験試料には、細胞、蛋白質または細胞の膜抽出物、または体液、例えば血液、血清、血漿または尿が含まれる。上述の方法において用いられる試験試料は、アッセイフォーマット、検出方法の性質およびアッセイすべき試料として用いられる組織、細胞または抽出物により様々であろう。蛋白質抽出物または細胞の膜抽出物を製造する方法は当該技術分野においてよく知られており、用いるシステムにより試験しうる試料を得るために容易に適合させることができる。

【0185】

キットは、先に記載した検出方法を実施するために必要な全ての試薬を含む。キットは、(i) 上述の抗体を含む第1の容器手段、および(ii) 抗体の結合パートナーと標識を含むコンジュゲートを含む第2の容器手段を含むことができ

る。別の好ましい態様においては、キットは以下の1またはそれ以上を含む1またはそれ以上の他の容器をさらに含む：洗浄試薬および結合した抗体の存在を検出する試薬。

【0186】

検出試薬の例には、限定されないが、標識二次抗体が含まれ、あるいは、一次抗体が標識されている場合には、標識された抗体と反応する発色団、酵素、または抗体結合試薬が含まれる。コンパートメント化キットは核酸プローブキットについて上述したようなものでもよい。当業者は、本発明に記載される抗体を、当該技術分野においてよく知られる確立されたキットフォーマットの1つに容易に取り込ませることができることを容易に認識するであろう。

【0187】

ホスファターゼと相互作用する化合物の単離

本発明はまた、本発明の蛋白質ホスファターゼに結合する化合物を検出する方法に関する。該方法は、化合物を本発明のホスファターゼとともにインキュベートし、ホスファターゼに結合した化合物の存在を検出することを含む。化合物は、複雑な混合物、例えば、血清、体液、または細胞抽出物中に存在していてもよい。

【0188】

本発明はまた、ホスファターゼの活性またはホスファターゼの結合パートナーの活性のアゴニストまたはアンタゴニストを検出する方法に関する。該方法は、本発明のホスファターゼを産生する細胞を化合物の存在下でインキュベートし、ホスファターゼ活性またはホスファターゼ結合パートナーの活性のレベルの変化を検出することを含む。このようにして同定される化合物は、化合物の存在を示す活性の変化を生ずるであろう。化合物は、複雑な混合物、例えば、血清、体液、または細胞抽出物中に存在していてもよい。いったん化合物が同定されれば、当該技術分野においてよく知られる技術を用いてこれを単離することができる。

【0189】

ポリペプチド活性の調節：

本発明はさらに、治療を必要とする患者に、配列番号13、配列番号14、配

列番号15, 配列番号16, 配列番号17, 配列番号18, 配列番号19, 配列番号20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, 配列番号24, からなる群より選択されるポリペプチド, その機能的誘導体, およびそのフラグメントの活性を調節する物質を投与することにより, 疾病または異常な状態を治療する方法を提供する。好ましくは, 疾病は, 慢性関節リウマチ, アテローム性動脈硬化症, 自己免疫疾患, 臓器移植, 心筋梗塞, 心筋症, 発作, 腎不全, 酸化的ストレス関連神経変性性疾患, 代謝性および生殖疾患, および癌からなる群より選択される。

【0190】

疾患または疾病の治療に有用な物質は, 好ましくは, 問題とする疾病または疾患の治療に対応する活性についての1またはそれ以上のアッセイにおいて陽性の結果を示す。ポリペプチドの活性を調節する物質は, 好ましくは, 限定されないが, アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび蛋白質ホスファターゼの阻害剤を含む。

【0191】

"予防する"との用語は, 生物が異常な状態に罹患するかこれを発達させる可能性を減少させることを表す。

【0192】

"治療する"との用語は, 生物において治療効果を有し, 異常な状態を少なくとも部分的に緩和するかまたは排除することを表す。

【0193】

"治療効果"との用語は, 異常な状態を引き起こすかまたはこれに寄与する阻害または活性化率を表す。治療効果は, 異常な状態の1またはそれ以上の症状をある程度緩和する。異常な状態の治療に関して, 治療効果は, 以下の1またはそれ以上を表すことができる: (a) 細胞の増殖, 成長, および/または分化の増加; (b) 細胞死の阻害(すなわち, 遅延または停止); (c) 変性の阻害; (d) 異常な状態に伴う1またはそれ以上の症状のある程度の緩和; および(e) 影響を受けた細胞の集団の機能の増強。異常な状態に対して有効性を示す化合物は, 本明細書に記載されるようにして同定することができる。

【0194】

"異常な状態"との用語は、生物の細胞または組織における、その生物における正常な機能からはずれた機能を表す。異常な状態は、細胞増殖、細胞分化、または細胞生存に関連する。異常な状態にはまた、変則的な細胞サイクル進行、すなわち有糸分裂および減数分裂を通る正常な細胞サイクル進行が変則的であることが含まれる。

【0195】

異常な細胞増殖状態には、癌、例えば繊維性およびメサンギウム疾患、異常な新脈管形成および脈管形成、創傷治癒、乾癬、真性糖尿病、および炎症が含まれる。

【0196】

異常な分化状態には、限定されないが、神経変性性疾患、遅い創傷治癒速度、および遅い組織移植治癒速度が含まれる。

【0197】

異常な細胞生存状態は、プログラムされた細胞死（アポトーシス）経路が活性化されているかまたは排除されている状態に関連する。多くの蛋白質ホスファターゼがアポトーシス経路に関連している。蛋白質ホスファターゼのいずれかの機能の異常は、細胞の不死または未成熟細胞死につながりうる。

【0198】

シグナル伝達プロセスにおけるホスファターゼポリペプチドの機能に関連して、"異常な"との用語は、生物において過剰発現または過小発現されているか、その触媒活性が野生型蛋白質ホスファターゼ活性より低いかまたは高いように変異しているか、天然の結合パートナーともはや相互作用できないように変異しているか、別の蛋白質キナーゼまたは蛋白質ホスファターゼによりもはや修飾されないか、または天然の結合パートナーともはや相互作用しない、ホスファターゼを表す。

【0199】

"投与する"との用語は、化合物を生物の細胞または組織内に取り込ませる方法に関連する。異常な状態は、生物の細胞または組織が生物中または生物外に存在

する場合、予防または治療することができる。生物の外に存在する細胞は、細胞培養皿中で維持または成長させることができる。生物中に含まれる細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多くの手法が存在し、例えば、限定されないが、経口、非経口、経皮、注入およびエアロゾル外用が含まれる。生物外の細胞については、当該技術分野には化合物を投与する多数の手法が存在し、例えば、限定されないが、細胞マイクロインジェクション手法、トランスフォーメーション手法、および担体手法が含まれる。

【0200】

異常な状態はまた、シグナル伝達経路に異常を有する一群の細胞を有する生物に化合物を投与することにより、予防または治療することができる。次に、化合物の投与が生物機能に及ぼす影響をモニターすることができる。生物は、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、またはヤギであり、より好ましくは有尾サルまたは無尾サルであり、最も好ましくはヒトである。

【0201】

ホスファターゼ関連活性の促進またはアンタゴナイズ

本発明はまた、哺乳動物において本発明の標的および天然の結合パートナーに関連する活性をアゴナイズ（促進）するかまたはアンタゴナイズする方法を含む。該方法は、前記哺乳動物に、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、その機能的誘導体、およびそのフラグメントに対するアゴニストまたはアンタゴニストを前記アゴニズムまたはアンタゴニズムを生ずるのに十分な量で投与することを含む。本発明はまた、ホスファターゼに関連する機能をアゴナイズまたはアンタゴナイズするのに十分な量のアゴニストまたはアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において、上述のポリペプチド活性のアゴニストまたはアンタゴニストを用いて疾病を治療する方法を含む。

【0202】

治療を行うために、ホスファターゼ遺伝子と特定の疾病状態との関連性を評価することができる。本発明の1つの態様にしたがえば、マイクロアレイ発現分析

を実施して、本発明にしたがう種々のホスファターゼ遺伝子の発現プロファイルを確立し、このことにより、その発現がある種の疾病状態と相関する遺伝子を同定することができる。

【0203】

種々のホスファターゼファミリーは広範な機能が示唆されているため、そのような治療は、広範な範囲の疾病、例えば、癌、病態生理学的低酸素症、心臓血管疾患、パピヨン-ルフェーヴル症候群、コウデン疾病、外胚葉性形成異常、メビウス症候群、ブヨルンスタッド症候群、バナヤン-ゾナナ症候群、精神分裂病および過誤腫について実施することができる。特に重要なものは、種々のタイプの癌の治療である。したがって、本発明は、乳癌、尿生殖器癌、前立腺癌、頭頸部癌、肺癌、滑膜肉腫、腎臓細胞癌腫、非小細胞肺癌、肝細胞癌腫、膵臓内分泌腫瘍、胃癌、神経膠芽細胞腫、結腸直腸癌、および甲状腺癌等の病理を治療する方法を提供する。

【0204】

例えば、種々の組織起源のRNA試料から作成したcDNAをナイロン膜にスポットし、目的とするホスファターゼ遺伝子に由来する放射性標識プローブでハイブリダイズさせた。実施例3および表5を参照すると、用いたホスファターゼ遺伝子配列には、以下のものが含まれる：配列番号4、配列番号5および配列番号7。下記の表5の記載において議論されているように、正常組織、腫瘍組織、種々の細胞株、およびP53野生型および変異型からの試料を用いて、発現アレイを作成した。実施例3に示されるように、種々の組織起源および細胞株における試験したホスファターゼ遺伝子の相対的遺伝子発現レベルは、ハイブリダイズしたシグナルのSyber Green I染色を測定することにより定量した。表に記録される数値の読みは、バックグラウンド計数を引いた後、ds cDNAまたは変性プローブからのハイブリダイゼーション結果に対して標準化した。

【0205】

表5の意味のある発現レベルは、本明細書に提供される対応する核酸およびアミノ酸配列の情報とともに、種々の組織起源における目的とするホスファターゼ遺伝子の発現プロファイルを構成する。そのような発現プロファイルデータは、

本発明にしたがう治療計画に対する指針を与える。例えば、表5の試料、"M14"細胞株(悪性黒色腫)を参照すると、配列番号4の発現のレベルはゼロである。配列番号7の発現のレベル(58)は下限に近い。しかし、配列番号5の発現のレベル(2, 528)は、有意により高い。そのような横の比較により、配列番号5によりコードされるホスファターゼ遺伝子が黒色腫に関与するであろうことが明らかとなる。すなわち、この遺伝子の機能活性を操作することは、悪性黒色腫の癌性の状態に影響を与えるかもしれない。例えば、配列番号5(SGP003)は、配列番号17(MKPファミリーに属する蛋白質、表1に示される)をコードする。したがって、悪性黒色腫に関連する癌状態を治療する方法は、例えば、この癌に罹患した患者に、配列番号17により表される蛋白質のホスファターゼの活性を調節することができる薬剤を投与することでありうる。したがって、本発明の好ましい態様にしたがう発現分析は、開示される治療方法に特異性および有効性を付与する。

【0206】

実施例3に記載される方法と類似の方法において生成された発現データに基づいて、多くの比較および相関分析の方法を実施することができることが理解されるであろう。これらの方法は上述の議論に基づいて当業者には明らかであり、したがって、本発明の範囲内に含まれる。同様に、これらの比較および相関分析から導かれる推論を用いて、本発明にしたがう治療方法または投与計画を具体化することができる。例えば、正常組織および疾病組織の試料の対を用いて発現アレイを作成すると、得られるデータはある種の疾病状態においてどのホスファターゼ遺伝子が異なるように発現されているかを特定して示し、このことにより、本発明にしたがう治療方法の標的を形成するであろう。すなわち、インビボまたはインビトロのいずれかでこれらの活性を制御することができる調節剤または薬剤を同定することができ、所定の疾病状態の治療において用いることができる。

【0207】

本発明にしたがえば、疾病または疾患の診断道具として、本明細書に開示されるホスファターゼ遺伝子配列から誘導されるヌクレオチドプローブ、例えば本明細書に記載されるものを用いて、試料中においてホスファターゼを検出する方法

が提供される。種々のホスファターゼファミリーは広範な機能が示唆されているため、広範な種類の疾病、例えば、癌、病態生理学的低酸素症、心臓血管疾患、パピヨン-ルフェーヴル症候群、コウデン疾病、外胚葉性形成異常、メビウス症候群、ブヨルンスタッド症候群、バナヤン-ゾナナ症候群、精神分裂病および過誤腫について、そのような診断の尺度を用いることができる。特に重要なものは、種々のタイプの癌の診断である。本発明の診断方法を用いて、乳癌、尿生殖器癌、前立腺癌、頭頸部癌、肺癌、滑膜肉腫、腎臓細胞癌腫、非小細胞肺癌、肝細胞癌腫、膵臓内分泌腫瘍、胃癌、神経膠芽細胞腫、結腸直腸癌、および甲状腺癌について試験することができる。

【0208】

同様の特徴において、正確な診断を行うために、ホスファターゼ遺伝子と特定の疾病状態との関連性の程度を判定することは有用である。そのような判定は、本発明の1つの態様にしたがってマイクロアレイ発現分析を実施することにより行うことができる。その発現がある種の疾病状態と関連するホスファターゼ遺伝子は、上述した方法により同定することができる。

【0209】

マイクロアレイデータから得られたデータはまた、特定の病因に罹患しているかもしれない患者を診断するのに用いることができる。したがって、本発明にしたがって黒色腫に関連する癌状態を診断する方法は、試験試料（患者から集めることができる）を配列番号17により表される蛋白質をコードする核酸配列とハイブリダイズすることができるヌクレオチドプローブと接触させ；次に、ハイブリダイズしたプローブ：標的の対の存在を検出し、神経芽細胞腫に関連する癌状態の指標としてそのようなハイブリダイゼーションのレベルを定量することである。すなわち、本発明の好ましい態様にしたがって発現分析は、開示される診断方法に特異性および有効性を付与する。

【0210】

上述したように、本明細書に記載される方法と類似の方法において生成された発現データに基づいて、多くの比較および相関分析の方法を実施することができる。これらも必然的に本発明の範囲内に含まれる。同様に、これらの比較および

相関分析から導かれる推論を用いて、本発明にしたがう診断方法を具体化することができる。注目すべき1つのシナリオは、正常組織と疾病組織の試料の対を用いて発現アレイを作成すると、得られるデータはある種の疾病状態においてどのホスファターゼ遺伝子が異なるように発現されているかを特定して示し、このことにより、上述の診断方法において用いられる診断マーカーとして働くことができる。

【0211】

本発明にしたがえば、疾病または疾患の診断道具として、試料中でホスファターゼを検出する別の方法が提供される。該方法は、本発明に開示されるホスファターゼ遺伝子、例えば図2に挙げられるアミノ酸配列をコードする遺伝子の核酸標的領域を制御領域と比較し；そして次に、標的領域と制御領域との間の配列または量の相違を、疾病または疾患の指標として検出することを含む。この方法はまた、広範な種類の疾病、例えば、癌、病態生理学的低酸素症、心臓血管疾患、パピヨン-ルフェーヴル症候群、コウデン疾病、外胚葉性形成異常、メビウス症候群、ブヨルンスタッド症候群、バナヤン-ゾナナ症候群、精神分裂病および過誤腫の診断に用いることができる。特に重要なものは種々のタイプの癌の診断である。上述の診断方法において述べたように、この特定の方法を同様に用いて、乳癌、尿生殖器癌、前立腺癌、頭頸部癌、肺癌、滑膜肉腫、腎臓細胞癌腫、非小細胞肺癌、肝細胞癌腫、膵臓内分泌腫瘍、胃癌、神経膠芽細胞腫、結腸直腸癌、および甲状腺癌について試験することができる。

【0212】

標的領域は、ホスファターゼ遺伝子中の目的とする任意の特定の領域であることができ、例えば、上流の制御領域が含まれる。ホスファターゼのファミリーにおいては、上流の制御領域の配列の変動はしばしば機能的な関連性を有しており、そのいくつかは、ある種の疾病状態を引き起こすのに重要であるかもしれない。ある種のホスファターゼ遺伝子における標的領域の量の変化、例えば、レセプター結合部位等の制御領域のコピー数の変化もまた、機能的分化のメカニズムを表し、したがって、ある種の疾病状態と関連しているであろう。したがって、標的領域の配列および量を対照領域と比較してそのような相違を検出することは、

疾病状態の検出に有効につながるであろう。

【0213】

本発明の1つの態様においては、マイクロアレイ実験を用いて、疾病状態と1組のホスファターゼ遺伝子間の標的領域の変動との間の潜在的な関連性を同定することができる。例えば、目的とするホスファターゼ遺伝子の、それぞれ所定の標的領域および対照領域に対応する核酸プローブを作成することができる。正常組織および疾病組織からの試料を用いて、上でおよび実施例3で議論されるように、マイクロアレイを作成することができる。このように作成されたアレイにこれらのプローブをハイブリダイズさせることにより、目的とする領域の正常および疾病状態における比較プロファイルが得られ、標的領域と対照領域との、問題とする疾病に特徴的な相違の定義を導くことができる。次に、そのような定義は、本発明にしたがう副次的に言及される診断方法において用いられるような、疾病状態の指標として働くことができる。多くの同等または類似の方法を用いて、この方法にしたがう診断を実施することができることが理解されるであろう。これらは、本明細書に提供される実施例に基づいて当業者には明らかであり、したがって、本発明の範囲内に含まれる。

【0214】

疾病の新規な治療を発見することをめざして、生物医学研究者および化学者は、蛋白質ホスファターゼの機能を阻害する分子を設計し、合成し、試験してきた。いくつかの小さい有機分子は蛋白質ホスファターゼの機能を調節する化合物の一群を形成する。蛋白質ホスファターゼの機能を阻害することが報告されている分子の例としては、限定されないが、ビス単環式、二環式または複素環式アリアル化合物 (PCT WO 92 / 20642, 1992年11月26日公開, Maguire et al.), ビニレン-アザインドール誘導体 (PCT WO 94 / 14808, 1994年7月7日公開, Ballinari et al.), 1-シクロプロピル-4-ピリジル-キノロン類 (米国特許5,330,992), スチリル化合物 (米国特許5,217,999), スチリル置換ピリジル化合物 (米国特許5,302,606), ある種のキナゾリン誘導体 (欧州特許出願0566266A1), セレオインドール類およびセレニド類 (PCT

WO94/03427, 1994年2月17日公開, Denny et al.), 三環式ポリヒドロキシ化合物 (PCT WO92/21660, 1992年12月10日公開, Dow), およびベンジルホスホン酸化合物 (PCT WO91/15495, 1991年10月17日公開, Dow et al.) が挙げられる。

【0215】

細胞膜を横切ることができ、酸加水分解に耐性の化合物は、患者に経口投与された後に高度に生物利用性となることができるため、治療剤として利点を有する可能性がある。しかし、これらの蛋白質ホスファターゼ阻害剤の多くは、蛋白質ホスファターゼの機能を弱くしか阻害しない。さらに、多くは種々の蛋白質ホスファターゼを阻害し、したがって、疾病の治療剤として多くの副作用を引き起こすであろう。

【0216】

しかし、ある種のインドリノン化合物は、酸耐性であり膜透過性である有機分子の一群を形成する。WO96/22976 (1996年8月1日公開, Ballinari et al.) は、オキシインドール環に融合したテトラリン、ナフタレン、キノリン、およびインドール置換基を有する水溶性インドリノン化合物を記載する。これらの二環式置換基は、さらに、ヒドロキシル化アルキル、リン酸、およびエーテル成分等の極性成分で置換されている。"Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の米国特許出願08/702,232および"Benzyldiene-Z-Indoline Compounds for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の米国特許5,880,141 (米国特許出願08/485,323), 国際公開WO96/40116, (1996年12月19日公開, Tang et al.) および国際公開WO96/22976 (1996年8月1日公開, Ballinari et al.) (これらはすべて、図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてこ

こに引用する)は、オキシインドール環に融合した他の二環式成分ならびに単環式成分を有するインドリノン化合物のインドリノン化学ライブラリを記載する。

"Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and methods for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の出願08/702,232(1996年8月23日出願),"Benzylidene-Z-Indoline Compounds for the Treatment of Diseases"と題するTang et al.の米国特許5,880,141(米国特許出願08/485,323,1995年6月7日出願),およびWO96/22976(1996年8月1日公開,Ballinari et al.)は、インドリノンの合成方法、細胞におけるインドリノン化合物の生物学的活性を試験する方法およびインドリノン誘導体の阻害パターンを教示する。

【0217】

ホスファターゼ活性を調節することができる物質の他の例には、限定されないが、チロホスチン、キナゾリン、キノキソリン、およびキノリンが含まれる。上述のキナゾリン、チロホスチン、キノリン、およびキノキソリンには、よく知られる化合物、例えば文献に記載される化合物が含まれる。例えば、キナゾリン類を記載する代表的刊行物には、Barker et al., 欧州特許公開0520722A1; Jones et al., 米国特許.4,447,608; Kabbe et al., 米国特許.4,757,072; Kaul and Vougioukas, 米国特許5,316,553; Kreighbaum and Comer, 米国特許4,343,940; Pegg and Wardleworth, 欧州特許公開0562734A1; Barker et al., (1991) Proc. of Am. Assoc. for Cancer Research 32, 327; Bertino, J.R., (1979) Cancer Research 3, 293-304; Bertino, J.R., (1979) Cancer Research 9(2 part 1), 293-304; Curtin et al., (1986) Br. J. Ca

ncer 53, 361-368; Fernandes et al., (1983) Cancer Research 43, 1117-1123; Ferris et al. J. Org. Chem. 44(2), 173-178; Fryet al., (1994) Science 265, 1093-1095; Jackman et al., (1981) Cancer Research 51, 5579-5586; Jones et al. J. Med. Chem. 29(6), 1114-1118; Lee and Skibo, (1987) Biochemistry 26(23), 7355-7362; Lemus et al., (1989) J. Org. Chem. 54, 3511-3518; Ley and Seng, (1975) Synthesis 1975, 415-522; Maxwell et al., (1991) Magnetic Resonance in Medicine 17, 189-196; Mini et al., (1985) Cancer Research 45, 325-330; Phillips and Castle, J. (1980) Heterocyclic Chem. 17(19), 1489-1596; Reece et al., (1977) Cancer Research 47(11), 2996-2999; Sculler et al., (1986) Cancer Immunol. and Immunother. 23, A65; Sikora et al., (1984) Cancer Letters 23, 289-295; Sikora et al., (1988) Analytical Biochem. 172, 344-355 (これらすべては、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)が含まれる。

【0218】

キノキサリン類は, Kaul and Vougioukas, 米国特許5, 316, 553 (図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に記載される。

【0219】

キノリン類は, Dolle et al., (1994) J. Med. Chem. 37, 2627-2629; McGuire, J. (1994) Med. C

hem. 37, 2129 - 2131; Burke et al., (1993) J. Med. Chem. 36, 425 - 432, および Burke et al. (1992) Bio Organic Med. Chem. Letters 2, 1771 - 1774 (これらすべては, 図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する) に記載される。

【0220】

チロホスチン類は, Alien et al., (1993) Clin. Exp. Immunol. 91, 141 - 156; Anafi et al.. (1993) Blood 82:12, 3524 - 3529; Baker et al., (1992) J. Cell. Sci. 102, 543 - 555; Bild er et al., (1991) Amer. Physiol. Soc. pp. 6363 - 6143: C721 - C730; Brunton et al., (1992) Proceedings of Amer. Assoc. Cancer Rsch. 33, 558; Bryckaert et al., (1992) Exp. Cell Research 199, 255 - 261; Dong et al., (1993) J. Leukocyte Biology 53, 53 - 60; Dong et al., (1993) J. Immunol. 151 (5), 2717 - 2724; Gazit et al.. (1989) J. Med. Chem. 32, 2344 - 2352; Gazit et al., (1993) J. Med. Chem. 36, 3556 - 3564; Kaur et al., (1994) Anti-Cancer Drugs 5, 213 - 222; King et al., (1991) Biochem. J. 275, 413 - 418; Kuo et al., (1993) Cancer Letter s 74, 197 - 202; Levitzki, A., (1992) The F ASEB J. 6, 3275 - 3282; Lyall et al.. (1989) J. Biol. Chem. 264, 14503 - 14509; Peters on et al., (1993) The Prostate 22, 335 - 345; Pillemer et al., (1992) Int. J. Cance r 50, 80 - 85; Posner et al., (1993) Molec

ular Pharmacology 45, 673-683; Rendu et al., (1992) Biol. Pharmacology 44(5), 881-888; Sauro and Thomas, (1993) Life Sciences 53, 371-376; Sauro and Thomas, (1993) J. Pharm. and Experimental Therapeutics 267(3), 119-1125; Wolbring et al., (1994) J. Biol. Chem. 269(36), 22470-22472; および Yoneda et al., (1991) Cancer Research 51, 4430-4435; (これらはすべて、図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する) に記載される。

【0221】

調節剤として用いることができる他の化合物には、オキシンドリノン、例えば、米国特許出願08/702,232(1996年8月23日出願、図面を含め本明細書の一部としてここに引用する) に記載されるものが含まれる。

【0222】

組換えDNA技術

ホスファターゼ核酸分子を含むDNA構築物およびこれらの構築物を含む細胞：

本発明はまた、宿主細胞において転写を開始するのに有効なプロモーターおよび上述の核酸分子を5'から3'方向に含む組換えDNA分子に関する。さらに、本発明は、ベクターおよび上述の核酸分子を含む組換えDNA分子に関する。本発明はまた、細胞において機能的な転写領域、上述のポリペプチドに対応するアミノ酸配列をコードするRNA配列に相補的な配列、および前記細胞において機能的な転写終止領域を含む核酸分子に関する。上述の分子は、単離されたおよび/または精製されたDNA分子でありうる。

【0223】

本発明はまた、上述の核酸分子を含み、したがってポリペプチドを発現しうる細胞または生物に関する。ポリペプチドは、そのポリペプチドを発現するよう変更されている細胞から精製することができる。細胞が、細胞が通常は産生しないかまたは細胞が通常はより低いレベルで産生する蛋白質を産生するように遺伝子

操作により作成されている場合、細胞は"所望のポリペプチドを発現するよう変更されている"と言われる。当業者は、ゲノム、cDNA、または合成配列のいずれかを真核生物または原核生物細胞のいずれかに導入して発現させるための方法を容易に適用することができる。

【0224】

核酸分子、例えばDNAは、これが転写および翻訳制御情報を含むヌクレオチド配列を含み、かつそのような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に"動作可能なように連結されている"場合、ポリペプチドを"発現しうる"と言われる。動作可能な連結とは、制御DNA配列および発現が求められているDNA配列が、遺伝子配列の発現を可能とするような様式で接続されているような連結である。遺伝子配列の発現に必要な制御領域の詳細な性質は生物によって異なるであろうが、これは一般にプロモーター領域を含む。原核生物においては、プロモーター領域は、プロモーター（RNA転写の開始を指示する）ならびにRNAに転写されたときに合成の開始を合図するであろうDNA配列の両方を含む。そのような領域は、通常は転写および翻訳の開始に関与する5'-非コーディング配列、例えばTATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列等を含むであろう。

【0225】

所望の場合には、本発明のホスファターゼをコードする配列の3'側の非コーディング領域を上述の方法により得ることができる。この領域は、その転写終止制御配列、例えば終止およびポリアデニル化のために保持することができる。すなわち、本発明のホスファターゼをコードするDNA配列に天然に隣接している3'領域を保持することにより、転写終止シグナルを提供することができる。発現宿主細胞において転写終止シグナルが十分に機能性でない場合には、宿主細胞において機能的な3'領域で置き換えることができる。

【0226】

2つのDNA配列（例えば、プロモーター領域配列および本発明のホスファターゼをコードする配列）は、2つのDNA配列の連結の性質が、（1）フレームシフト変異を導入しない、（2）プロモーター領域配列が本発明のホスファター

ゼをコードする遺伝子配列の転写を指示する能力を妨害しない、または(3)本発明のホスファターゼの遺伝子配列がプロモーター領域配列により転写されることを妨害しない場合、動作可能なように連結されていると言われる。すなわち、プロモーター領域は、プロモーターがそのDNA配列の転写を行うことができる場合、DNA配列に動作可能なように連結されているであろう。すなわち、本発明のホスファターゼをコードする遺伝子を発現させるためには、適当な宿主により認識される転写および翻訳シグナルが必要である。

【0227】

本発明は、本発明のホスファターゼ(またはその機能的誘導体)をコードする遺伝子を原核生物または真核生物細胞のいずれかにおいて発現させることを包含する。原核生物宿主は、一般に、組換え蛋白質の製造において非常に有効でありかつ便利であり、したがって、本発明のホスファターゼのための1つの好ましい発現システムである。原核生物は、しばしば*E. coli*の種々の株により代表される。しかし、他の細菌株等の他の微生物株もまた用いることができる。

【0228】

原核生物系においては、宿主と適合性のある種に由来する複製部位および制御配列を含むプラスミドベクターを用いることができる。適当なプラスミドベクターの例には、pBR322、pUC118、pUC119等が含まれ、適当なファージまたはバクテリオファージベクターの例には、gt10、gt11等が含まれ、適当なウイルスベクターの例には、pMAM-neo、pKRC等が含まれる。好ましくは、本発明の選択されたベクターは、選択された宿主細胞において複製する能力を有する。

【0229】

認められている原核生物宿主には、細菌、例えば*E. coli*、*Bacillus*、*Streptomyces*、*Pseudomonas*、*Salmonella*、*Serratia*等が含まれる。しかし、そのような条件下においては、ポリペプチドはグリコシル化されない。原核生物宿主は発現プラスミド中のレプリコンおよび制御配列と適合性でなければならない。

【0230】

本発明のホスファターゼ（またはその機能的誘導体）を原核生物細胞において発現させるためには、本発明のホスファターゼをコードする配列が、機能的原核生物プロモーターと動作可能なように連結されていることが必要である。そのようなプロモーターは、構成的であってもよく、より好ましくは制御可能（すなわち、誘導可能または抑制解除可能）である。構成的プロモーターの例には、バクテリオファージの *int* プロモーター、pBR322の β -ラクタマーゼ遺伝子配列の *bla* プロモーター、およびpPR325のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列の *cat* プロモーター等が含まれる。誘導可能な原核生物プロモーターの例には、バクテリオファージの主要右および左プロモーター（ P_L および P_R ）、*E. coli*の *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, および *gal* プロモーター、 β -アミラーゼ（Ulmanen et al., *J. Bacteriol.* 162:176-182, 1985）および *B. subtilis*の β -28-特異的プロモーター（Gilman et al., *Gene Sequence* 32:11-20, 1984）、*Bacillus*のバクテリオファージのプロモーター（Gryczan, *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., NY, 1982）、および *Streptomyces* プロモーター（Ward et al., *Mol. Gen. Genet.* 203:468-478, 1986）が含まれる。原核生物プロモーターは、Glick (*Ind. Microbiol.* 1:277-282, 1987)、Cenatiempo (*Biochimie* 68:505-516, 1986)、および Gottesman (*Ann. Rev. Genet.* 18:415-442, 1984) により概説されている。

【0231】

原核生物細胞における適切な発現には、遺伝子コーディング配列の上流にリボソーム結合部位の存在が必要である。そのようなリボソーム結合部位は、例えば、Gold et al. (*Ann. Rev. Microbiol.* 35:365-404, 1981) に記載されている。制御配列、発現ベクター、トランスフォーメーション方法等の選択は、遺伝子を発現させるために用いられる宿主細

胞のタイプに依存する。本明細書において用いる場合，"細胞"，"細胞株"および"細胞培養"は互換的に用いることができ，そのような名称はすべて子孫を含む。すなわち，"トランスフォーマント"または"トランスフォームした細胞"との語句は，継代の数にかかわらず，初代対象細胞およびここから誘導された培養物を含む。また，意図的なまたは偶然の変異のために，すべての子孫がDNA含有物において精密に同一ではないかもしれないことが理解される。しかし，定義されるように，変異体子孫は元々のトランスフォームした細胞と同じ機能性を有する。

【0232】

本発明の発現システムにおいて用いることができる宿主細胞は，目的とするホスファターゼポリペプチドの発現において用いるのに適当である限り，特に限定されない。適当な宿主はしばしば真核生物細胞を含むことができる。好ましい真核生物宿主には，例えば，酵母，真菌，昆虫細胞，哺乳動物細胞（インビボまたは組織培養のいずれか）が含まれる。宿主として有用でありうる哺乳動物細胞には，HeLa細胞，繊維芽細胞由来の細胞，例えばVEROまたはCHO-K1，またはリンパ球由来の細胞，およびこれらの誘導体が含まれる。好ましい哺乳動物宿主細胞には，SP2/0およびJ558L，ならびに神経芽細胞腫細胞株，例えばIMR332が含まれ，これらは正しい翻訳後プロセッシングのよりすぐれた能力を提供することができる。

【0233】

さらに，植物細胞もまた宿主として利用可能であり，植物細胞と適合しうる制御配列，例えばカリフラワーモザイクウイルス35Sおよび19S，およびノパリンシンターゼプロモーターおよびポリアデニル化シグナル配列が利用可能である。他の好ましい宿主は昆虫細胞，例えば，*Drosophila larvae*である。昆虫細胞を宿主として用いる場合，ショウジョウバエアルコールデヒドロゲナーゼプロモーターを用いることができる（Rubin, *Science* 240:1453-1459, 1988）。あるいは，バキュロウイルスベクターを，昆虫細胞において本発明のホスファターゼを大量に発現するよう遺伝子工学処理することができる（Jasny, *Science* 238:1653, 1987; Miller et al., *Genetic Engineering*

ng, Vol. 8, Plenum, Setlow et al., eds., p. 277-297, 1986)。

【0234】

酵母がグルコースの豊富な培地中で成長するときに大量に産生される解糖系酵素をコードする活発に発現されている配列からのプロモーターおよび終止要素を組み込んだ一連の酵母発現システムの任意のものを用いることができる。既知の解糖系遺伝子配列はまた、非常に効率的な転写制御シグナルを提供することができる。酵母は、翻訳後修飾を行うこともできる点において、実質的な利点を与える。強いプロモーター配列および高コピー数プラスミドを用いる多くの組換えDNA戦略が存在し、これを酵母において所望の蛋白質を製造するために用いることができる。酵母はクローン化された哺乳動物遺伝子のリーダー配列を認識して、リーダー配列を有するペプチド(すなわちプレペプチド)を分泌する。哺乳動物宿主における本発明のホスファターゼの発現にはいくつかの可能なベクター系が利用可能である。

【0235】

宿主の性質に応じて、広範な種類の転写および翻訳制御配列を用いることができる。転写および翻訳制御シグナルは、制御シグナルが高レベルの発現を有する特定の遺伝子配列に関連しているウイルス起源、例えばアデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルス、サルウイルス等から誘導することができる。あるいは、哺乳動物発現産物、例えばアクチン、コラーゲン、ミオシンなどからのプロモーターを用いることができる。転写開始制御シグナルは、遺伝子配列の発現を調節することができるように、抑制または活性化を可能とするものを選択することができる。興味深いものは、温度を変化させることにより発現を抑制または開始することができるように温度感受性であるか、化学物質(例えば代謝産物)制御を行うことができる制御シグナルである。

【0236】

本発明のホスファターゼの真核生物宿主における発現には、真核生物制御領域を使用することが必要である。そのような領域は、一般に、RNA合成の開始を指示するのに十分なプロモーター領域を含む。好ましい真核生物プロモーターに

は、例えば、マウスメタロチオネインI遺伝子配列のプロモーター (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273 - 288, 1982); ヘルペスウイルスのTKプロモーター (McKnight, Cell 31: 355 - 365, 1982); SV40初期プロモーター (Benoit et al., Nature (London) 290: 304 - 31, 1981); および酵母gal4遺伝子配列プロモーター (Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6971 - 6975, 1982; Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 5951 - 5955, 1984) が含まれる。

【0237】

真核生物mRNAの翻訳は、最初のメチオニンをコードするコドンから開始される。この理由のため、真核生物プロモーターと、本発明のホスファターゼ（またはその機能的誘導体）をコードするDNA配列との間の連結には、メチオニンをコードする介在コドン（すなわちAUG）が含まれないことを確実にすることが好ましい。そのようなコドンの存在は、融合蛋白質（AUGコドンが本発明のホスファターゼのコーディング配列と同じリーディングフレームにある場合）またはフレームシフト変異（AUGコドンが本発明のホスファターゼのコーディング配列と同じリーディングフレームにない場合）の形成のいずれかをもたらす。

【0238】

本発明のホスファターゼをコードする核酸分子および動作可能なように連結されたプロモーターは、レシピエントである原核生物または真核生物細胞中に、非複製DNAまたはRNA分子のいずれかとして導入することができ、これは、直線状分子またはより好ましくは閉環状分子のいずれでもよい。そのような分子は自己複製することができないため、遺伝子の発現は導入された配列の過渡的発現により生ずる。あるいは、導入されたDNA配列が宿主染色体中にインテグレートされることにより永久発現が得られる。

【0239】

所望の遺伝子配列を宿主細胞染色体中にインテグレートしうるベクターを用い

ることができる。導入されたDNAをその染色体中に安定にインテグレートしている細胞は、発現ベクターを含有する宿主細胞の選択を可能とする1またはそれ以上のマーカーを導入することにより選択することができる。マーカーは、栄養要求性宿主に対する栄養、殺生物剤耐性（例えば抗生物質、または重金属、例えば銅）等を提供することができる。選択マーカー遺伝子配列は、発現させるべきDNA遺伝子配列に直接連結してもよく、または同じ細胞にコトランスフェクションにより導入してもよい。mRNAの最適な合成には追加の要素も必要であろう。これらの要素には、スプライシングシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終止シグナルが含まれる。そのような要素を組み込んだcDNA発現ベクターには、Okayama (Mol. Cell. Biol. 3: 280-289, 1983) により記載されるものが含まれる。

【0240】

導入された核酸分子は、レシピエント宿主中で自己複製可能なプラスミドまたはウイルスベクター中に取り込ませることができる。この目的のために広範な種類のベクターの任意のものをを用いることができる。特定のプラスミドまたはウイルスベクターの選択において重要な因子には、ベクターを含むレシピエント細胞を認識しベクターを含まないレシピエント細胞から選択することの容易性；特定の宿主において所望されるベクターのコピー数；およびベクターを異なる種の宿主細胞間で"シャトル"しうるものが望ましいか否かが含まれる。

【0241】

好ましい原核生物ベクターには、E. coli中で複製しうるプラスミド（例えば、pBR322, ColE1, pSC101, pACYC184, VX; "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 上掲）などのプラスミドが含まれる。Bacillusプラスミドには、pC194, pC221, pT127等が含まれる (Gryczan, The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY, pp. 307-329, 1982)。適当なStreptomycesプラスミドには、p1J101 (Kendall et al., J. Bacteriol. 169: 4177-4183

, 1987), および *Streptomyces* バクテリオファージ, 例えば C31 (Chater et al., Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 45 - 54, 1986) が含まれる。 *Pseudomonas* プラスミドは John et al. (Rev. Infect. Dis. 8: 693 - 704, 1986), および Izaki (Jpn. J. Bacteriol. 33: 729 - 742, 1978) により概説されている。

【0242】

好ましい真核生物プラスミドには, 例えば, BPV, ワクチニア, SV40, 2 - ミクロンサークル等, またはそれらの誘導体が含まれる。そのようなプラスミドは当該技術分野においてよく知られている (Botstein et al., Miami Winter Symp. 19: 265 - 274, 1982; Broach, "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 445 - 470, 1981; Broach, Cell 28: 203 - 204, 1982; Bollon et al., J. Clin. Hematol. Oncol. 10: 39 - 48, 1980; Maniatis, Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, pp. 563 - 608, 1980)。

【0243】

構築物を含むベクターまたは核酸分子を発現用に用意した後, DNA構築物は, 種々の適当な手段, すなわち, トランスフォーメーション, トランスフェクション, コンジュゲーション, プロトプラスト融合, エレクトロポレーション, 粒子銃技術, リン酸カルシウム沈澱, 直接マイクロインジェクション等により, 適当な宿主細胞中に導入することができる。ベクターを導入した後, レシピエ

ント細胞を、ベクター含有細胞の成長を選択する選択培地中で成長させる。クローニングされた遺伝子の発現により、本発明のホスファターゼまたはそのフラグメントが産生される。これは、トランスフォームした細胞中でそのまま起こるか、またはこれらの細胞を分化させるよう誘導した後に起こる（例えば、プロモデオキシウラシルを神経芽細胞腫等に投与することにより）。本発明のペプチドを形成するために、種々のインキュベーション条件を用いることができる。最も好ましい条件は、生理学的条件を模倣した条件である。

【0244】

トランスジェニック動物：

本発明に関連するトランスジェニック動物の製造には、種々の方法が利用可能である。DNAを受精可能卵の前核に注入した後、雄前核と雌前核を融合させるか、またはDNAを胚性細胞（例えば、2細胞胚の核）の核に注入した後、細胞分裂を開始させることができる（Brinster et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985）。本発明の無機イオンレセプターヌクレオチド配列を有するよう改変したウイルス、特にレトロウイルスを胚に感染させることができる。

【0245】

胚の内部細胞塊から誘導され培養中で安定化させた多能性幹細胞を、培養中で操作して本発明のヌクレオチド配列を取り込ませることができる。トランスジェニック動物は、そのような細胞を胚盤胞中に移植し、これを仮母に移植し、分娩させることにより製造することができる。トランスジェニック実験に適当な動物は、標準的な商業的供給源、例えばCharles River (Wilmington, MA), Taconic (Germantown, NY), Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN)等から入手することができる。

【0246】

齧歯類胚を操作する方法およびDNAを接合子の前核に注入する方法は、当業者によく知られている（Hogan et al., 上掲）。魚、両生類卵および鳥類のためのマイクロインジェクション法は、Houdebine and

Chourrout (Experientia 47:897-905, 1991) に詳述されている。DNAを動物の組織中に導入する他の方法は、米国特許, 4,945,050 (Sandford et al., 1990年7月30日) に記載されている。

【0247】

一例にすぎないが、トランスジェニックマウスを製造するためには、雌マウスを過剰排卵誘発する。雌を雄といっしょに置き、交配した雌をCO₂窒息または頸部脱臼により殺し、切除した卵管から胚を回収する。まわりの丘細胞を除去する。次に、前核胚を洗浄し、注入時まで保存する。ランダムな周期の成人雌を精管切除雄と対にする。レシピエント雌はドナー雌と同じ時に交配させる。次に胚を外科的に移す。トランスジェニックラットを製造する方法はマウスの場合と類似する方法である (Hammer et al., Cell 63:1099-1112, 1990)。

【0248】

胚性幹 (ES) 細胞を培養し、次にエレクトロポレーション、リン酸カルシウム/DNA沈澱および直接注入等の方法を用いてDNAをES細胞中に導入することによりトランスジェニック動物を製造する方法もまた当業者によく知られている (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach, E. J. Robertson, ed., IRL Press, 1987)。

【0249】

ランダム遺伝子インテグレーションを含む場合には、本発明の配列を含むクローンを耐性をコードする遺伝子とともにコトランスフェクトすることができる。あるいは、ネオマイシン耐性をコードする遺伝子を、本発明の配列に物理的に連結させることができる。所望のクローンのトランスフェクションおよび単離は、当業者によく知られるいくつかの方法のいずれかを用いて実施することができる (E. J. Robertson, 上掲)。

【0250】

ES細胞中に導入されたDNA分子はまた、相同組換えのプロセスにより染色

体中にインテグレートされることができる (Capecchi, Science 244: 1288 - 1292, 1989)。組換え事象のポジティブ選択 (すなわち, neo耐性) および二重ポジティブ - ネガティブ選択 (すなわち, neo耐性およびガンシクロビル耐性) の方法, および続くPCRによる所望のクローンの同定は, Capecchi, 上掲および Joyner et al. (Nature 338: 153 - 156, 1989) に記載されており, これらの教示は, 図面を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する。この方法の最後の段階は, 標的とするES細胞を胚盤胞中に注入し, 胚盤胞を擬妊娠雌に移すことである。得られるキメラ動物を繁殖させ, 子孫をサザンブロッティングにより分析して, トランスジンを有する個体を同定する。非齧歯類哺乳動物および他の動物の製造方法は別の者により議論されている (Houdebine and Chourrout, 上掲; Pursel et al., Science 244: 1281 - 1288, 1989; and Simms et al., Bio/Technology 6: 179 - 183, 1988)。

【0251】

すなわち, 本発明は, 本発明のキナーゼをコードするトランスジンをまたはキナーゼの発現に影響する遺伝子を含むトランスジェニックの非ヒト哺乳動物を提供する。そのようなトランスジェニックの非ヒト哺乳動物は, キナーゼの導入の効果を研究するため, またはキナーゼの発現を制御 (すなわち, 追加の遺伝子, アンチセンス核酸, またはリボザイムの導入により) するためのインビボ試験系として特に有用である。

【0252】

"トランスジェニック動物"とは, 細胞中に人工的に挿入されたDNAを含む細胞を有する動物である。該DNAは, その細胞から発生した動物のゲノムの一部となる。好ましいトランスジェニック動物は, 霊長類, マウス, ラット, ウシ, ブタ, ウマ, ヤギ, ヒツジ, イヌおよびネコである。トランスジェニックDNAは, ヒトキナーゼをコードすることができる。動物における自然の発現は, レセプターの発現を減少させるのに有効な量のアンチセンスRNAまたはDNAを与えることにより減少させることができる。

【0253】

遺伝子治療

本発明のホスファターゼまたはその遺伝子配列は、遺伝子治療においても有用である（総説としてMiller, Nature 357:455-460, 1992）。Millerは、進歩により、ポジティブな初期の結果を示したヒト遺伝子治療に対する実用的なアプローチが得られたと述べている。遺伝子治療の基本的な科学はMulligan (Science 260:926-931, 1993) に記載されている。

【0254】

1つの好ましい態様においては、ホスファターゼのコーディング配列を含む発現ベクターを細胞に挿入し、細胞をインビトロで成長させ、次にこれを大量に患者に注入する。別の好ましい態様においては、選択されたプロモーター（例えば、強いプロモーター）を含むDNAセグメントを、本発明のホスファターゼをコードする内因性遺伝子を含む細胞中に、プロモーターセグメントが内因性ホスファターゼ遺伝子の発現を増強する様式で移送する（例えば、プロモーターセグメントをこれが内因性ホスファターゼ遺伝子に直接連結するように細胞内に移送する）。

【0255】

遺伝子治療は、腫瘍を標的とするホスファターゼcDNAを含むアデノウイルスの使用を含むことができる。全身ホスファターゼは、遺伝子工学処理した細胞の移植、ホスファターゼをコードするウイルスの注入、または裸のホスファターゼDNAの適当な組織への注入により増加する。

【0256】

そのような複合体の活性を調節するために、標的細胞集団を、蛋白質複合体の1またはそれ以上の変更された形の成分を導入することにより改変することができる。例えば、標的細胞中における複合体成分の活性を減少させるか阻害することにより、そのような状態につながる異常なシグナル伝達事象を減少させ、阻害し、または逆転させることができる。蛋白質複合体の他の成分と相互作用する能力を保持しているが、シグナル伝達において機能することができない成分の欠失

またはミスセンス変異体を用いて、異常な、有害なシグナル伝達事象を阻害することができる。

【0257】

ウイルス、例えばレトロウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、いくつかのRNAウイルス、またはウシパピローマウイルスに由来する発現ベクターを用いて、本発明の組換えホスファターゼをコードするヌクレオチド配列（例えばcDNA）を標的細胞集団（例えば腫瘍細胞）に輸送することができる。当業者によく知られる方法を用いて、コーディング配列を含む組換えウイルスベクターを構築することができる（Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989）。あるいは、蛋白質配列をコードする組換え核酸分子を裸のDNAとしてまたは再構築系、例えば標的細胞への輸送のためのリポソームまたは他の脂質系において用いることができる（例えば、Felgner et al., *Nature* 337:387-8, 1989）。ヒト遺伝子治療において用いるための、プラスミドDNAを細胞内に直接輸送するいくつかの他の方法が存在し、これはプラスミドDNAを蛋白質に複合体化させることによりDNAを細胞上のレセプターにターゲティングすることを含む（Miller, 上掲）。

【0258】

最も簡単な形においては、遺伝子輸送は、単にマイクロインジェクション工程により細胞の核内に最小量のDNAを注入することにより行うことができる（Capecchi, *Cell* 22:479-88, 1980）。組換え遺伝子は、いったん細胞内に導入されると、転写および翻訳に関する細胞の正常なメカニズムにより認識されることができ、遺伝子産物が発現される。より多数の細胞にDNAを導入するための他の方法も試みられている。これらの方法には、DNA

をCaPO₄で沈澱させピノサイトーシスにより細胞中に取り込ませるトランスフェクション(Chen et al., Mol. Cell Biol. 7:2745-52, 1987);細胞を高圧パルスに暴露して膜に穴をあけるエレクトロポレーション(Chu et al., Nucleic Acids Res. 15:1311-26, 1987);DNAを親油性ベヒクル中に封入し,これを標的細胞と融合させるリポフェクチン/リポソーム融合(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413-7417, 1987);および小さい発射体に結合させたDNAを用いる粒子衝撃(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9568-9572, 1990)が含まれる。DNAを細胞内に導入する他の方法は, DNAを化学的に修飾した蛋白質にカップリングさせることである。

【0259】

また, アデノウイルス蛋白質がエンドソームを不安定化させ, DNAの細胞への取り込みを促進しうることを示されている。アデノウイルスをDNA複合体を含む溶液と混合するか, または蛋白質架橋試薬を用いてアデノウイルスに共有結合したポリリジンにDNAを結合させることにより, 組換え遺伝子の取り込みおよび発現が実質的に改良される(Curiel et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 6:247-52, 1992)。

【0260】

本明細書において用いる場合, "遺伝子輸送"とは, 外来核酸分子を細胞中に導入する工程を意味する。遺伝子輸送は, 一般に, 遺伝子によりコードされる特定の産物の発現を可能とするために行われる。産物には, 蛋白質, ポリペプチド, アンチセンスDNAまたはRNA, または酵素的に活性なRNAが含まれる。遺伝子輸送は, 培養細胞中で, または動物への直接投与により行うことができる。一般に, 遺伝子輸送には, 核酸を非特異的レセプター媒介性相互作用により標的細胞と接触させ, 核酸を膜を通してまたはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込ませ, 核酸を原形質膜またはエンドソームから細胞質内に放出させる工程が含まれる。さらに, 発現には, 核酸が細胞の核に移動し, 転写のための適当な核

因子に結合することが必要である。

【0261】

本明細書において用いる場合、"遺伝子治療"とは、遺伝子輸送の1つの形であり、本明細書において用いられる遺伝子輸送の定義の中に含まれ、特にインビボでまたはインビトロで細胞から治療用産物を発現させるための遺伝子治療を表す。遺伝子輸送は、細胞でエクスピボで行い、次に患者に移植することにより、または、核酸または核酸蛋白質複合体を患者に直接投与することにより、行うことができる。

【0262】

別の好ましい態様においては、ホスファターゼポリペプチドをコードする核酸配列を有するベクターが提供され、ここで、核酸配列は特定の組織においてのみ発現される。組織特異的遺伝子発現を行う方法は、国際公開WO93/09236(1992年11月3日出願、1993年5月13日公開)に記載される。

【0263】

上述したすべてのベクターにおいて、本発明のさらに別の観点は、ベクターに含まれる核酸配列が、核酸の配列の一部または全てについて、上で定義したような付加、欠失または修飾を含んでいてもよいことである。

【0264】

別の好ましい態様においては、遺伝子置換の方法が記載される。本明細書において用いる場合、"遺伝子置換"とは、インビボで発現しうる核酸配列を動物に供給し、このことによりその動物に欠失しているかまたは不完全な内因性遺伝子の機能を提供することを意味する。

【0265】

医薬処方および投与経路

本明細書に記載される化合物は、それ自体で、または医薬組成物中でヒト患者に投与することができる。医薬組成物では、組み合わせ療法におけるように、化合物が他の活性成分と混合されているか、または適当な担体または賦形剤と混合されている。本発明の化合物の処方および投与の手法は"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publ

ishing Co., Easton, PAの最新版に見いだすことができる。

【0266】

投与経路：

投与の適当な経路には、例えば、経口、直腸、経粘膜、または腸投与；非経口輸送、例えば筋肉内、皮下、静脈内、骨髄内注入、ならびに鞘内、直接心室内、腹膜内、鼻腔内、または眼内注射が含まれる。

【0267】

あるいは、化合物を全身ではなく局所的に投与してもよく、これには、例えば、化合物を、しばしばデポ製剤または徐放製剤として直接固体腫瘍に注射することが含まれる。

【0268】

さらに、薬物はターゲティングされたドラッグデリバリーシステムにおいて、例えば腫瘍特異的抗体により被覆されたリポソーム中で投与してもよい。リポソームは腫瘍にターゲティングされ、選択的に取り込まれるであろう。

【0269】

組成物/処方：

本発明の医薬組成物は、当該技術分野においてよく知られる方法、例えば、限定されないが、慣用の混合、溶解、顆粒化、糖衣作成、研和、乳化、カプセル封入、捕捉、または凍結乾燥により製造することができる。

【0270】

すなわち、本発明にしたがって使用するための医薬組成物は、活性化合物を薬剤として使用することができる製品に加工することを容易にする賦形剤および補助剤を含む、1またはそれ以上の生理学的に許容しうる担体を用いて、慣用の方法で製剤することができる。適切な処方は、選択される投与経路に依存する。

【0271】

注射用には、本発明の薬剤を水性溶液、好ましくはハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中で処方することができる。経粘膜投与用には、浸透すべき障壁に適した浸透剤が処方に用いられる。そのような浸透剤は当該技術分野において一般に知られている。

【0272】

経口投与のためには、化合物を当該技術分野においてよく知られる薬学的に許容しうる担体と混合することにより化合物を容易に処方することができる。そのような担体は、本発明の化合物を、治療すべき患者による経口摂取のための錠剤、丸薬、糖衣剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として処方することを可能とする。適当な担体には、特に、ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトール等の糖類；トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、およびジャガイモデンプン等のセルロース製品、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン（PVP）等の増量剤などの賦形剤が含まれる。所望の場合には、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウム等の崩壊剤を加えてもよい。

【0273】

糖衣剤のコアは、適当なコーティングとともに供給される。この目的のためには、濃縮された糖溶液を用いることができる。これは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、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任意に含むことができる。識別のため、あるいは活性化合物の用量の異なる組合せを特徴づけるため、染料または色素を錠剤または糖衣剤コーティングに添加してもよい。

【0274】

経口で使用することができる医薬製剤は、ゼラチンから作成されるプッシュフィットカプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロール、ソルビトール等の可塑剤から作成される密封軟カプセルを含む。プッシュフィットカプセルは、活性成分を、ラクトース等の増量剤、デンプン等の結合剤、および/またはタルクおよびステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤、さらに任意に安定剤との混合物中に含むことができる。軟カプセルにおいては、活性化合物は脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコール等の適当な液体中に溶解または懸濁するこ

とができる。さらに安定剤を添加してもよい。経口投与用のすべての処方は、そのような投与に適切な用量で調製すべきである。

【0275】

口内投与のためには、組成物は、慣用的な方法で錠剤またはトローチ剤の形にすることができる。

【0276】

吸入による投与用には、本発明に従って用いられる化合物は、噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切な気体を用いて、加圧されたパックまたはネブライザーからエアゾルスプレイの形状で便利に輸送される。加圧されたエアゾルの場合、用量単位は計量された量を送達するべく備えられたバルブにより調節することができる。例えば吸入器または注入器において使用するためのゼラチン製のカプセルおよびカートリッジは、化合物の粉末混合物と、ラクトースまたはデンプン等の適切な粉末基剤とを含むよう処方することができる。

【0277】

化合物は、例えばボラス注射または連続注入による非経口投与用に処方することができる。注射用の処方は、単位用量にて、例えばアンプルにて、あるいは添加された保存料と共に多用量容器中で提供することができる。組成物は油性または水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、または乳濁液等の形状をとることができ、懸濁剤、安定剤および/または分散剤等の製剤物質を含んでいてもよい。

【0278】

非経口投与用の薬剤処方法は、水溶性の形態の活性化合物の水溶液を含む。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油性の注入用懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒またはベヒクルには、ゴマ油等の脂肪油、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド等の合成脂肪酸エステル、またはリポソーム等を含む。水性の注射用懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン等の、懸濁液の粘度を増加させる物質を含んでいてもよい。任意に、懸濁液はまた、高度に濃縮された溶液の調製を可能にする、当該化合物の溶解性を増加させる適切な安定剤または薬剤を含んでいてもよい。

【0279】

あるいは、活性成分は粉体の形態であって、使用前に適当なベヒクル、例えば発熱物質を含まない滅菌水を用いて構成することができる。

【0280】

化合物はまた、例えばカカオバターまたは他のグリセリド等の慣用の坐剤基剤を用いて、坐剤または停留浣腸等の直腸用組成物に処方することができる。

【0281】

上述した処方に加えて、化合物はまたデポ製剤として処方することができる。そのような長時間作用性の処方は、埋込み（例えば皮下または筋肉内への）によるか、または筋肉内注射により投与することができる。すなわち、例えば、化合物は、適当な高分子性または疎水性物質と共に（例えば許容される油剤中の乳濁液として）、イオン交換樹脂と共に、溶けにくい塩等の溶けにくい誘導体として、処方することができる。

【0282】

本発明の化合物のための薬学的担体は、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマーおよび水性相を含む共溶媒系であってもよい。共溶媒系はVPD共溶媒系であってもよい。VPDは、3%（w/v）ベンジルアルコール、8%（w/v）非極性界面活性剤ポリソルベート80、および65%（w/v）ポリエチレングリコール300を純粋エタノール中に作成した溶液である。VPD共溶媒系（VPD：D5W）は、VPDを5%デキストロースの水溶液中に1：1で希釈したものである。この共溶媒系は疎水性化合物をよく溶解し、それ自体、全身投与に際して低い毒性を示す。本来、共溶媒系の比率は、その溶解性および毒性特性を破壊することなく相当変化させることができる。さらに、共溶媒成分の同一性も変化させることができる。例えば、他の低毒性非極性界面活性剤をポリソルベート80の代わりに用いることができ、ポリエチレングリコールの分画サイズは様々でありうる。他の生体適合性ポリマー、例えばポリビニルピロリドンを用いることができ、他の糖または多糖類をデキストロースの代わりに用いることができる。

【0283】

あるいは、疎水的医薬化合物のための他の輸送系を用いてもよい。リポソームおよび乳剤は、疎水的薬剤のための輸送用ベヒクルまたは担体の例としてよく知られている。さらに、ある種の有機溶媒、例えばジメチルスルホキシドもまた用いることができるが、しばしば毒性がより高くなる。さらに、化合物は、持続放出系、例えば治療薬剤を含む固体疎水性ポリマーの準透過性マトリックスを用いて輸送することができる。種々の持続放出材料が当業者にはよく知られている。持続放出カプセルはその化学的性質に応じて、数週間から100日を越える期間、化合物を放出する。治療薬剤の化学的性質および生物学的安定性に応じて、さらに別の蛋白質安定化戦略を用いてもよい。

【0284】

医薬組成物はまた、適当な固体またはゲル相の担体または賦形剤を含んでいてもよい。そのような担体または賦形剤の例には、限定されないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコール等の高分子が含まれる。

【0285】

本発明のチロシンまたはセリン/トレオニンホスファターゼ調節化合物の多くは、薬学的に適合性のカウンターイオンとの塩として提供される。薬学的に適合性の塩は、多くの酸、例えば、限定されないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸等を用いて形成することができる。塩は、水性または他のプロトン性溶媒において、対応する遊離塩基の形よりもより溶解性である傾向にある。

【0286】

適切な投与計画：

本発明において使用するのに適した医薬組成物には、活性成分がその意図される目的を達成するのに有効な量で含まれている組成物が含まれる。より詳細には、治療上有効量とは、疾病の症状を予防、緩和または改善するのに、または治療している被験者の生存を長くするのに有効な化合物の量を意味する。本発明の化合物の治療上有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示に鑑みて、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0287】

患者に投与すべき化合物の投与量および生物に化合物を投与するモードを決定する方法は、米国特許出願08/702,282(1996年8月23日出願)および国際出願WO96/22976(1996年8月1日公開)(この両方について、図面および表を含めその全体を本明細書の一部としてここに引用する)に開示されている。当業者は、そのような記載が本発明に適用可能であり、容易に適合させることができることを理解するであろう。

【0288】

適切な投与量は、種々の因子、例えば、治療する疾病のタイプ、用いられる特定の組成物および患者のサイズおよび生理学的状態に依存する。本明細書に記載される化合物についての治療上有効量は、最初は培養細胞および動物モデルから見積もることができる。例えば、容量は、動物モデルにおいて、培養細胞アッセイにおいて決定された IC_{50} を最初に考慮した循環濃度範囲を達成する用量を処方することができる。動物モデルのデータを用いて、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。

【0289】

本発明の方法において用いられる任意の化合物について、治療上有効な用量は、最初は細胞培養アッセイから見積もることができる。例えば、動物モデルにおいて、培養細胞において決定された IC_{50} (すなわちチロシンまたはセリン/トレオニンホスファターゼ活性の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度)を含む循環濃度範囲を達成するような用量を処方することができる。そのような情報は、ヒトまたは他の被験体における有用な用量のさらに正確な決定のために用いることができる。

【0290】

本明細書に記載される化合物の毒性および治療有効性は、培養細胞または実験動物における標準的な薬理学的方法、例えば LD_{50} (集団の50%に致死的な用量)および ED_{50} (集団の50%に治療上有効な用量)を決定することにより、決定することができる。毒性と治療上有効性の用量の比は治療指数であり、 LD_{50} と ED_{50} の比率として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好まし

い。これらの培養細胞アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおいて用いるための投与量の範囲を定式化するために用いることができる。このような化合物の投与量は、好ましくは、 ED_{50} を含み毒性がほとんどまたは全くない循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いる投与形態および用いる投与経路により、この範囲内で様々でありうる。正確な処方、投与経路、および投与量は、個々の医師が、患者の状態を考慮して選択することができる（例えば、Fingl et al. 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1, p. 1を参照）。

【0291】

毒性研究は、血液細胞組成を測定することにより実施することもできる。例えば、以下のようにして、適当な動物モデルにおいて毒性研究を行うことができる

- 1) 化合物をマウスに投与し（未処置対照マウスも用いなければならない）；
- 2) 各処置群の1匹のマウスの尾部静脈から定期的に血液試料を採取し；そして
- 3) 試料を、赤血球および白血球数、血液細胞組成物、およびリンパ球対多形核細胞のパーセントについて分析する。各用量計画および対照からの結果の比較は、毒性が存在するか否かを示す。

【0292】

各毒性研究の終わりに動物を犠牲にすることにより（好ましくは、the American Veterinary Medical Association guidelines Report of the American Veterinary Medical Assoc. Panel on Euthanasia, Journal of American Veterinary Medical Assoc. / 202:229-249, 1993にしたがって）、さらなる研究を実施することができる。次に、各処置群の代表的動物を、肉眼剖検により転移の直接証拠、異常な不健康、または毒性について調べることができる。組織の肉眼異常を記録し、組織を組織学的に調べる。体重または血液成分の減少を引き起こす化合物、および主要な臓器に有害な影響を有する化合物はあまり好ましくない。一般に、有害な影響が大きければ大きいほど、化合物はより好ましくない。

【0293】

癌の治療においては、疎水性薬剤の予測される1日用量は1 - 500 mg / 日、好ましくは、1 - 250 mg / 日、最も好ましくは、1 - 50 mg / 日の範囲である。薬剤は、活性成分の血漿レベルが治療の有効性を維持するのに十分であるかぎり、より少ない頻度で投与することができる。

【0294】

血漿レベルは薬剤の有効性を反映するはずである。一般に、化合物が強力であればあるほど、有効性を達成するのに必要な血漿レベルは低い。

【0295】

薬剤および代謝産物の血漿半減期および血漿、腫瘍、および主要な臓器における生物学的分布を決定して、疾患を阻害するのに最も適当な薬剤の選択を容易にすることができる。そのような測定を実施することができる。例えば、薬剤で処置した動物の血漿についてHPLC分析を行い、X線、CATスキャン、およびMRI等の検出方法を用いて放射性標識した化合物の位置を決定することができる。スクリーニングアッセイにおいて強力な阻害活性を示すが、不十分な薬物動力的特性を有する化合物は、化学構造の変更および再試験により最適化することができる。この点に関しては、優れた薬物動力的特性を示す化合物をモデルとして用いることができる。

【0296】

投与量および間隔は、個々に、活性成分がホスファターゼ調節効果を維持するのに十分な血漿レベル、すなわち最小有効濃度(MEC)を与えるよう調節することができる。MECは、各化合物について異なるが、インビトロのデータ、例えば、限定されないが、本明細書に記載されるアッセイを用いて、ホスファターゼの50 - 90%の阻害を達成するのに必要な濃度から見積もることができる。MECを達成するのに必要な投与量は、個々の特性および投与経路に依存するであろう。しかし、血漿濃度はHPLCアッセイまたはバイオアッセイを用いて決定することができる。

【0297】

投与間隔もまた、MEC値を用いて決定することができる。化合物は、10 -

90%の時間，好ましくは30 - 90%の時間，最も好ましくは50 - 90%の時間，MECより高い血漿レベルを維持する投与計画を用いて投与すべきである。

【0298】

局所投与または選択的取り込みの場合には，薬剤の有効な局所濃度は血漿濃度とは関係ないであろう。

【0299】

投与される特定の組成物の量は，もちろん，治療中の患者，患者の体重，苦痛の激しさ，投与方法，および担当医師の判断に依存するであろう。

【0300】

包装：

組成物は，所望の場合には，活性成分を含む1またはそれ以上の単位用量形を含んでいてもよいパックまたはディスペンサー装置中で提供することができる。パックは，例えば，ブリスターパックなどの金属またはプラスチック箱を含むことができる。パックまたはディスペンサー装置には，投与の指示が添付されていてもよい。パックまたはディスペンサー装置はまた，薬剤の製造，使用，または販売を規制する政府機関によって規定された形式の，容器に付随した注意書が添付されていてもよく，その注意書はヒトまたは獣医学的投与用のポリヌクレオチドの形状の当該機関による承認を反映するものである。そのような注意書は，例えば米国食品医薬品局により処方箋調剤薬として承認されたラベルによるものか，または承認された製品に差込まれたものでもよい。適合した薬学的担体中に処方された，本発明の化合物を含む組成物もまた製造され，適当な容器内に配置され，さらに指示された条件による処置のためにラベルを付すことができる。ラベル上に示される適切な状態としては，腫瘍の治療，新脈管形成の阻害，線維症，糖尿病等の治療が挙げられる。

【0301】

機能的誘導体

本発明はまた，本発明のポリペプチドまたは核酸の機能的誘導体を提供する。"機能的誘導体"は，本発明のポリペプチドまたは核酸の"化学的誘導体"，"フラ

グメント"または"変種"を意味し、これらの用語は以下に定義される。機能的誘導体は、蛋白質の機能の少なくとも一部、例えば蛋白質に特異的な抗体との反応性、非触媒ドメインにより媒介される酵素活性または結合活性を保持しており、これにより本発明にしたがう有用性を有する。遺伝コードの縮重のため、多くの異なる核酸配列が同じアミノ酸配列をコードすることができることは当該技術分野においてよく知られている。同じく、アミノ酸を保存的に変更して、元の機能的性を保持する蛋白質またはポリペプチドを得ることができることも当該技術分野においてよく知られている。いずれの場合においても、すべての順列が本明細書の開示によりカバーされることが意図される。

【0302】

本明細書に記載される単離された核酸分子の機能的等価物も本発明の範囲に含まれる。遺伝コードの縮重のため、あるコドンと同じアミノ酸を規定する他のコドンで置き換え、同じ蛋白質を生じさせることができる。既知のアミノ酸は、メチオニンおよびトリプトファンを除き、2以上のコドンによりコードすることができるため、核酸配列は実質的に様々でありうる。すなわち、本発明の遺伝子の一部または全部を合成して、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12に記載される配列からなる群より選択される核酸配列と有意に異なる核酸配列を得ることができる。しかし、これによりコードされるアミノ酸配列は保存される。

【0303】

さらに、核酸配列は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12に記載される配列、またはその誘導体からなる群より選択される核酸の式またはその誘導体の5'-末端および/または3'-末端で少なくとも1つのヌクレオチドを付加、欠失または置換することにより得られるヌクレオチド配列を含んでいてもよい。その付加、欠失または置換が、ヌクレオチド配列によりコードされる、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号

20, 配列番号21, 配列番号22, 配列番号23, および配列番号24に記載される配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を変更しない限り, 任意のヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをこのように用いることができる。例えば, 本発明は, 本発明の核酸配列またはその誘導体の5' - 末端に開始コドンとしてATGを付加することにより, または本発明のヌクレオチド配列またはその誘導体の3' - 末端に終止コドンとしてTTA, TAGまたはTGAを付加することにより得られる任意の核酸配列を含むことを意図する。さらに, 本発明の核酸分子は, 必要に応じて, これらの5' - 末端および/または3' - 末端に付加された制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有することができる。

【0304】

所定の核酸配列のそのような機能的変更により, これに融合した外来核酸配列によりコードされる異種蛋白質の分泌および/またはプロセッシングが促進される機会が与えられる。したがって, 遺伝コードにより許容される本発明のホスファターゼ遺伝子およびそのフラグメントのヌクレオチド配列のすべての変種は本発明に含まれる。

【0305】

さらに, コドンを削除するかまたは1またはそれ以上のコドンを縮重コドン以外のコドンと置換して, 構造的に改変されているが, 未改変核酸分子により産生されるポリペプチドと実質的に同じ有用性または活性を有するポリペプチドを製造することが可能である。当該技術分野において認識されているように, 2つのポリペプチドは機能的に同等であり, これらの核酸分子の間の相違が遺伝コードの縮重に関連しない場合であっても, これらの製造を生じさせる2つの核酸分子も機能的に同等である。

【0306】

複合体の"化学的誘導体"は, 通常は蛋白質の一部ではない追加の化学的成分を含む。蛋白質またはペプチドの共有結合修飾は, 本発明の範囲内に含まれる。そのような修飾は, 以下に記載するように, ペプチドの標的アミノ酸残基を選択された側鎖または末端残基と反応しうる有機誘導化剤と反応させることにより, 分子中に導入することができる。

【0307】

システイン残基は、最も一般的にはアルファ - ハロアセテート（および対応するアミン）、例えばクロロ酢酸またはクロロアセトアミドと反応させて、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システイン残基は、ブromotriphloroacetone, クロロアセチルホスフェート, N - アルキルマレイミド, 3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド, メチル2 - ピリジルジスルフィド, p - クロロ水銀ベンゾエート, 2 - クロロ水銀 - 4 - ニトロフェノール, またはクロロ7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾールと反応させることにより誘導化する。

【0308】

ヒスチジン残基は、pH 5.5 - 7.0 でジエチルプロカーボネートと反応させることにより誘導化することができる。これは、この薬剤がヒスチジンの側鎖に比較的特異的であるためである。臭化パラブromoフェナシルもまた有用である。反応は、好ましくは、0.1 M カコジル酸ナトリウム中でpH 6.0で行う。

【0309】

リジンおよびアミノ末端残基はコハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤による誘導化は、リジン残基の電荷を逆転させる効果を有する。1級アミン含有残基を誘導化するための他の適当な試薬には、イミドエステル、例えば、メチルピコリンイミデート；ピリドキサルホスフェート；ピリドキサル；クロロホウ化水素；トリニトロベンゼンスルホン酸；O - メチルイソウレア；2, 4 - ペンタンジオン；およびトランスアミナーゼに触媒されるグリオキシレートとの反応が含まれる。

【0310】

アルギニン残基は慣用的な試薬の1つまたはいくつかと反応させることにより修飾する。これには、例えば、フェニルグリオキサル, 2, 3 - ブタンジオン, 1, 2 - シクロヘキサジオン, およびニンヒドリンがある。アルギニン残基の誘導化には、グアニジン官能基の高いpKaのため、反応をアルカリ条件中で行うことが必要である。さらに、これらの試薬はリジンの基ならびにアルギニンアルファアミノ基とも反応することができる。

【0311】

チロシン残基は、芳香族性ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンと反応させることにより光学的標識を導入するための修飾のよく知られる標的である。最も一般的には、N - アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを用いて、それぞれO - アセチルチロシル種および3 - ニトロ誘導体を生成する。

【0312】

カルボキシル側鎖（アスパラギン酸およびグルタミン酸）は、カルボジイミド（ $R' - N - C - N - R'$ ），例えば1 - シクロヘキシル - 3 - （2 - モルホリニル（4 - エチル）カルボジイミドまたは1 - エチル - 3 - （4 - アゾニア - 4 , 4 - ジメチルペンチル）カルボジイミドと反応させることにより、選択的に修飾する。さらに、アスパラギン酸およびグルタミン酸残基は、アンモニウムイオンと反応させることにより、アスパラギンおよびグルタミン残基に変換する。

【0313】

グルタミンおよびアスパラギン残基は、しばしば脱アミド化して、対応するグルタミン酸およびアスパラギン酸残基に変換する。あるいは、これらの残基をより穏和な酸性条件下で脱アミド化する。これらの残基のいずれの形も本発明の範囲内である。

【0314】

二官能性薬剤による誘導化は、例えば、蛋白質の成分ペプチドを互いに、または複合体中の他の蛋白質と、または水不溶性支持体マトリクスと、または他の高分子担体と架橋するのに有用である。一般に用いられる架橋薬剤としては、例えば、1, 1 - ビス（ジアゾアセチル） - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4 - アジドサリチル酸のエステル、ホモ二官能性イミドエステル（3, 3' - ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）等のジスクシンイミジルエステルを含む）、および二官能性マレイミド、例えばビス - N - マレイミド - 1, 8 - オクタンが挙げられる。メチル - 3 - [p - アジドフェニル]ジチオールプロピオイミデート等の誘導化薬剤により、光の存在下で架橋を形成しうる光活性化可能な中間体を得られる。あるいは、反応性の水不溶性マトリクス、例えば臭化シアン活性化炭水化物およ

び米国特許3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;および4,330,440に記載される反応性基質を蛋白質固定化のために用いることができる。

【0315】

他の修飾としては、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリンまたはトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のアルファアミノ基のメチル化(Creighton, T. E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86 (1983)), N末端アミンのアセチル化、および場合によりC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0316】

そのような誘導化された成分は、安定性、溶解性、吸収、生物学的半減期等を改良することができる。あるいは、これらの成分は、蛋白質複合体の望ましくない副作用を排除するかまたは緩和することができる。そのような効果を媒介する成分は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)に開示されている。

【0317】

"フラグメント"との用語は、これが由来する全長ポリペプチドより短い長さを有する蛋白質または複合体のアミノ酸配列に由来するポリペプチドを示すものとして用いられる。そのようなフラグメントは、例えば、全長蛋白質の蛋白質分解性切断により製造することができる。好ましくは、フラグメントは、蛋白質をコードするDNA配列を適当に改変して、C末端、N末端、および/または天然配列中の1またはそれ以上の部位において1またはそれ以上のアミノ酸を除去することにより、組換えにより得る。蛋白質のフラグメントは、本明細書に記載されるように、シグナル伝達を調節するように作用する物質のスクリーニングに有用である。そのようなフラグメントは、天然の複合体の1またはそれ以上の特徴的部分を保持しているであろうことが理解される。そのような保持される特徴の例

としては、触媒的活性；基質特異性；無傷の細胞中における他の分子との相互作用；制御機能；または天然の複合体またはそのエピトープに対する抗体との結合が挙げられる。

【0318】

本発明の範囲内に入ることが意図される別の機能的誘導体は、天然のポリペプチドに対して、1またはそれ以上のアミノ酸を欠失しているか、追加のまたは置換されたアミノ酸を含む"変種"ポリペプチドである。変種は、蛋白質のDNAコーディング配列を適当に改変して、C末端、N末端、および/または天然配列中の1またはそれ以上の部位において1またはそれ以上のアミノ酸のためのコドンが付加、除去、および/または改変することにより、天然に生ずる複合体成分から誘導することができる。追加、置換および/または追加アミノ酸を有するそのような変種は、上述するように、天然の蛋白質の1またはそれ以上の特徴的部分を保持していることが理解される。

【0319】

アミノ酸残基が除去、挿入および/または置換されている蛋白質の機能的誘導体は、当業者によく知られる標準的な手法を用いて製造することができる。例えば、機能的誘導体の改変された成分は、改変されたコード配列を生成するように、DNAコード配列中のヌクレオチドを修飾する部位特異的突然変異手法（Adelman et al., 1983, DNA 2:183に例示されている）を用いて、その後上述したような手法を用いてこの組換えDNAを原核生物または真核生物宿主細胞中で発現させることにより、製造することができる。あるいは、アミノ酸が削除、挿入および/または置換されている蛋白質は、当該技術分野においてよく知られる方法を用いて、直接化学合成により便利に製造することができる。蛋白質の機能的誘導体は、典型的には天然の蛋白質と同じ質の生物学的活性を示す。

【0320】

本発明はまた、核酸配列が天然の複合体の1またはそれ以上の特徴的部分を含む本発明にしたがうホスファターゼをコードするか否かを検出する方法を提供する。記載されるように、そのような保存された特徴の例には以下のものが含まれ

る：触媒活性；基質特異性；無傷の細胞における他の分子との相互作用；制御機能；または天然の複合体に特異的な抗体またはそのエピトープとの結合。したがって、本発明は、所定の核酸分子によりコードされるポリペプチドホスファターゼの1またはそれ以上の特徴、特に、触媒ドメインの存在を分析するアッセイを提供する。

【0321】

この目的のため、適当なアッセイは、ホスファターゼ蛋白質を精製し定量することから開始することができる。次に、例えば、一連の希釈を行い、加水分解しうる基質、および任意にポリペプチドの触媒活性を増加させることができる還元剤を含む緩衝液（例えばA B T緩衝液）中でインキュベートすることにより、蛋白質をアッセイすることができる。好ましくは、基質はp - ニトロフェニルホスフェート（p N P P）であり、還元剤はジチオスレイトール（D T T）であり、mM濃度はそれぞれ4 Xおよび1 Xであらう。インキュベーションは、活性により、室温で約2分間から一夜でありうる。反応を停止するためには、NaOHを加え、これは約100 μlの10 N NaOHでありうる。懸濁液を遠心分離し、上清をOD 410 nmで分析して、蛋白質ホスファターゼが触媒特性を示すか否かを判定することができる。

【0322】

表およびその記載

表1は、各遺伝子の名前、各遺伝子の分類、配列中のオープンリーディングフレームの位置、および対応するペプチドの長さを表す。データは、左から右に、以下のものを表す："遺伝子名"、"ID # n a"、"ID # a a"、"FL / C a t"、"スーパーファミリー"、"グループ"、"ファミリー"、"NA長さ"、"ORF開始"、"ORF終了"、"ORF長さ"、および"AA長さ"。"遺伝子名"は、ホスファターゼまたはホスファターゼ様酵素をコードする配列に与えられた名前を表す。各遺伝子は、"SGP"名称およびその後の番号により表される。SGP名は、通常は、1つの連続配列("コンティグ")に構築された多数の重複配列を表す。"ID # n a"および"ID # a a"は、本明細書において各核酸およびアミノ酸配列に与えられた同定番号を表す。"FL / C a t"は、遺伝子の長さを表し、FL

は全長を, "C a t"は触媒ドメインのみが示されていることを表す。このカラム中の"P a r t i a l"とは, 配列が部分的蛋白質ホスファターゼ触媒ドメインをコードすることを示す。"スーパーファミリー"とは, 遺伝子が二重特異性ホスファターゼ, 蛋白質チロシンホスファターゼまたはセリントレオニンホスファターゼであるかを識別する。"グループ"および"ファミリー"は, 配列ホモロジーにより定義され, 先に確立されている系統発生分析に基づく蛋白質ホスファターゼの分類を表す(The Protein Phosphatase Factsbook, Nick Tonks, Shirish Shenolikar, Harry Charbonneau, Academic Pr, 2000)。"NA長さ"は, 対応する核酸配列の長さをヌクレオチドで表す。"ORF開始"は, オープンリーディングフレームの開始ヌクレオチドを表す。"ORF終了"は, オープンリーディングフレームの終止コドンを除く最後のヌクレオチドを表す。"ORF長さ"は, オープンリーディングフレームの長さをヌクレオチドで表す。"AA長さ"は, 対応する核酸配列においてコードされるペプチドの長さをアミノ酸で表す。

【0323】

表1 - オープンリーディングフレーム

【表1】

遺伝子名	ID#na	ID#aa	FL/Cat	スーパーファミリー	グループ	ファミリー	NA_長さ	ORF開始	ORF終了	ORF長さ	AA_長さ
SGP006	1	13	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	6374	34	3183	3150	1049
SGP002	2	14	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	2732	538	2535	1998	665
SGP001	3	15	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	2260	709	2205	1497	498
SGP018	4	16	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	4361	208	3609	3402	1133
SGP003	5	17	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	1262	240	902	663	220
SGP014	6	18	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	1917	31	1680	1650	549
SGP060	7	19	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	636	1	636	636	211
SGP008	8	20	FL	二重ホスファターゼ	DSP	STYX	1326	1	990	990	329
SGP039	9	21	FL	セリンホスファターゼ	STP	PP2C	1083	1	1083	1083	360
SGP040	10	22	FL	セリンホスファターゼ	STP	PP2C	1725	1	1725	1725	574
SGP012	11	23	Cat	チロシンホスファターゼ	RPTP	PTPd	4719	1	4719	4719	1573
SGP024	12	24	部分	チロシンホスファターゼ	RPTP	PTPd	354	1	357	357	118

表2は、本明細書に記載される遺伝子の以下の特徴を示す：染色体位置、一塩基多型 (SNPs)、dbESTにおける表示、および反復領域。示されるデータは、左から右に、以下のとおりである："遺伝子名"、"ID#na"、"ID#a a"、"FL/Cat"、"スーパーファミリー"、"グループ"、"ファミリー"、"染色体"、"SNPs"、"dbEST_ヒット"、および"反復"。最初の7つのカラム(すなわち、"遺伝子名"、"ID#na"、"ID#a a"、"FL/Cat"、"スーパーファミリー"、"グループ"、"ファミリー")の内容は、表1について上述したとおりである。"染色体"は、遺伝子の細胞遺伝学的位置を表す。"SNPs"カラムの情報は、候補一塩基多型 (SNPs) の核酸位置および縮重性を示す。"dbESTヒット"は、対応する遺伝子に対して少なくとも100bpの100%同一性を含む、ESTの公共のデータベース (dbEST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) 中の登録物の受託番号を示す。これらのESTはdbESTのblastnにより同定した。"反復"は、複雑性が低く、いくつかの別々の遺伝子中に存在する約20bpの長さの短い配列の位置に関する情報を含む。これらの反復は、NCBI (nrna) の非重複核酸データベースに対するDNA配列のblastnにより同定した。この反復カラムに含まれるためには、配列は典型的にはその長さにわたり100%同一性を有し、典型的には少なくとも5つの異なる遺伝子中に存在する。

【0325】

表2 - CHR, SNPs, dbEST, 反復

【表2】

遺伝子名	ID#na	ID#aa	FL/Cat	スーパーファミリー	グループ	ファミリー	染色体	SNPs	dbEST_ヒット	反復
SGP006	1	13	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	12q21.3-q22	6222=R (ccaacataagtggcacar) dbSNP/rs881179	BE793092.1, AI651213.1, BE256978.1	Alu 5750-6010; 5750-5770; 2610-2631
SGP002	2	14	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	12p11.1-p12.1	none	BE897795;	2610-2631
SGP001	3	15	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	Xp11.1-11.3	2929=M (agaagagtcgagtaom) dbSNP/ss1765941; 1161=S (catctaccccaatgas) dbSNP/ss1765940	AI272231, BF206586,	579-598
SGP018	4	16	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	NA	none	BF114881	993-1014
SGP003	5	17	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	CHR10	none	none	311-334
SGP014	6	18	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	10q21.3	none	AA723271, AW444890.1, AA435513.1	none
SGP060	7	19	FL	二重ホスファターゼ	DSP	MKP	8p11.1-q11.1 centromeric	none	BF207232, BF314818, AW953216.1	none
SGP008	8	20	FL	二重ホスファターゼ	DSP	STYX	20q11.2	871=S (cagcagccctccgagggaaaccs) dbSNP/ss1389419	AW406620.1, BF377364.1, AW593296.1	1251-1270
SGP039	9	21	FL	セリンホスファターゼ	STP	PP2C	NA	none	BE147139.1	none
SGP040	10	22	FL	セリンホスファターゼ	STP	PP2C	8q21.3	none	AV706533.1, AV705571.1, AV710801.1	none
SGP012	11	23	Cat	チロシンホスファターゼ	RPTP	PTPd	NA	none	AL042532.1, AI881571,AW872677	3105 - 3124
SGP024	12	24	部分	チロシンホスファターゼ	RPTP	PTPd	NA	none	none	none

表3は、ホスファターゼ触媒ドメインの程度および境界を示す。カラムの表題は以下のとおりである："遺伝子名"、"ID#na"、"ID#aa"、"FL/Cat"、"ドメイン"、"Phos開始"、"Phos終了"、"プロファイル開始"、"プロファイル終了"。カラム"遺伝子名"、"ID#na"、"ID#aa"、"PL/Cat"の内容は表1について上述したとおりである。"Phos開始"、"Phos終了"、"プロファイル開始"および"プロファイル終了"は、隠れマルコフモデルを用いて得た、触媒範囲の境界を規定するデータを表す (<http://pfam.wustl.edu/index.html>)。蛋白質全体中の触媒ドメインの境界は、"Phos開始"および"Phos終了"のカラムで示される。3つのプロファイルを用いた。1つは173アミノ酸の長さの二重特異性ホスファターゼ(DSP)について；1つは301アミノ酸の長さのSTPについて；1つは264アミノ酸の長さPTPについてである。(用いたプロファイルは<http://pfad.wustl.edu/>に示される)。プロファイルが全長触媒ドメインを認識する蛋白質は、"プロファイル開始"が1であり、"プロファイル終了"は3つのファミリーについて以下のとおりである：DSPは173、STPは301、PTPは264。部分的触媒ドメインを有する遺伝子は、"プロファイル開始"が1より大きく(ホスファターゼドメインの開始が欠失していることを示す)、および/または"プロファイル終了"が261より小さい(ホスファターゼドメインのC末端が欠失していることを示す)。各配列は完全触媒ドメインを包含するが、ただし、SGP024は、PTPプロファイルのアミノ酸205-264である部分触媒ドメインを有する。

【0327】

表3 - ホスファターゼドメイン

【表3】

遺伝子名	ID#na	ID#aa	FL/Cat	ドメイン	ホスファターゼ開始	ホスファターゼ終了	プロファイル開始	プロファイル終了
SGP006	1	13	FL	DSP	308	446	1	173
SGP002	2	14	FL	DSP	158	297	1	173
SGP001	3	15	FL	DSP	307	441	1	173
SGP018	4	16	FL	DSP	185	330	1	173
SGP003	5	17	FL	DSP	54	199	1	173
SGP014	6	18	FL	2 DSPs (37-181 & 368-520)	37 & 368	181 & 520	1	173
SGP060	7	19	FL	DSP	61	204	1	173
SGP008	8	20	FL	DSP	98	235	1	173
SGP039	9	21	FL	蛋白質ホスファターゼ 2C	91	344	1	301
SGP040	10	22	FL	蛋白質ホスファターゼ 2C	209	497	1	301
SGP012	11	23	Cat	PTP	1010	1259	1	264
SGP024	12	24	部分	PTP	3	58	205	264

表4は、非重複蛋白質配列のNCBIデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html>)に対するアミノ酸配列のスミス・ウォーターマン類似性検索(マトリックス:Pam100;ギャップオープン/イクステンションペナルティー12/2)の結果を示す。カラム標題は以下のとおりである:"遺伝子名","ID#na","ID#aa","FL/Cat","スーパーファミリー","グループ","ファミリー","Pスコア","aa長さ","aaIDマッチ","%同一性","%類似性","ACC#nraaマッチ","説明","クエリー開始","クエリー終了","標的開始",および"標的終了"。次のカラム:"遺伝子名","ID#na","ID#aa","FL/Cat","ファミリー"の内容は表1について上述したとおりである。"Pスコア"はスミス・ウォーターマン確率スコアを表す。この数値はアラインメントが偶然により生ずるおよその確率を表す。すなわち、非常に低い数値,例えば $2.10E-64$ は、クエリーとデータベース標的との間に非常に顕著なマッチがあることを示す。"aa長さ"は、蛋白質の長さをアミノ酸で表す。"aaIDマッチ"は、アラインメント中で同一であるアミノ酸の数を示す。"%同一性"は、アラインメントした領域にわたって同一であるヌクレオチドのパーセントを示す。"%類似性"は、アラインメント全体にわたって類似するアミノ酸のパーセントを示す。"ACC#nraaマッチ"は、非重複蛋白質のNCBIデータベース中で最も類似する蛋白質の受託番号を示す。"説明"は、非重複蛋白質NCBIデータベース中で最も類似する蛋白質の名前を含む。"クエリー開始"はホスファターゼ("クエリー")中のアラインメントが開始するアミノ酸番号を表す。"クエリー終了"はホスファターゼ("クエリー")中のアラインメントが終了するアミノ酸番号を表す。"標的開始"はNRAAからのスミス・ウォーターマンヒット("標的")中のアラインメントが開始するアミノ酸番号を表す。"標的終了"はNRAAからのスミス・ウォーターマンヒット("標的")中のアラインメントが終了するアミノ酸番号を表す。SGP006については3つの登録物が存在し、SGP014については2つの登録物が存在することに注意されたい。これらの追加の列は異なるデータベース"標的"を用いるアラインメントの異なる領域を記述する(詳細については以下を参照)。

【0329】

表4 - スミス・ウォーターマン

【表4】

遺伝子名	ID#na	ID#aa	FL/Cat	ファミリー	Pスコア	aa_長さ	ae_ID_マッチ	%同一性	%類似性	ACC#_naab_マッチ	説明	クエリー開始	クエリー終了	クエリー開始	クエリー終了
SGP006	1	13	FL	MKP	0	1049	715	100	100	BAA92536.1	KIAA1298 蛋白質 [Homo sapiens] MAP キナーゼホスファターゼ	322	1049	11	738
SGP006	1	13	FL	MKP	1.50E-99	1049	248	46	59	BAA89534.1	[Drosophila melanogaster]	120	477	199	551
SGP006	1	13	FL	MKP	6.80E-58	1049	119	41	59	NP_060327.1	仮定蛋白質 FLJ20515 [Homo sapiens]	1	263	1	283
SGP002	2	14	FL	MKP	1.10E-157	665	304	46	60	NP_004411.1	二重特異性ホスファターゼ 8 [Homo sapiens]	13	665	14	625
SGP001	3	15	FL	MKP	6.30E-133	498	250	47	60	BAA89534.1	MKP [Drosophila melanogaster]	1	442	1	522
SGP018	4	16	FL	MKP	2.20E-27	1133	79	45	63	NP_057448.1	蛋白質 ホスファターゼ LOC51207 [Homo sapiens]	162	334	23	194
SGP003	5	17	FL	MKP	3.40E-54	220	91	49	68	NP_057448.1	蛋白質 ホスファターゼ LOC51207 [Homo sapiens]	22	206	12	197
SGP014	6	18	FL	MKP	7.50E-122	549	198	88	88	NP_057448.1	蛋白質 ホスファターゼ LOC51207 [Homo sapiens]	324	549	1	198
SGP014	6	18	FL	MKP	8.20E-36	549	75	45	65	NP_004081.1	二重特異性ホスファターゼ 3 [Homo sapiens]	20	179	8	174
SGP060	7	19	FL	MKP	1.10E-48	211	86	53	72	NP_057448.1	蛋白質 ホスファターゼ LOC51207 [Homo sapiens]	48	205	31	191
SGP008	8	20	FL	STYX	4.40E-172	329	260	92	92	CAC10008.1	新規蛋白質 [Homo sapiens]	63	329	1	275
SGP039	9	21	FL	PP2C	1.00E-106	360	164	98	99	AAD17235.1	PP 2C [Mus musculus]	133	299	1	167
SGP040	10	22	FL	PP2C	0	574	574	100	100	NP_060914.1	ピルビン酸チロシロゲナーゼホスファターゼ [Homo sapiens]	1	574	1	574
SGP012	11	23	Cat	PTPd	0.00E+00	1573	1053	60	70	NP_031981.1	胚性幹細胞ホスファターゼ [Mus musculus]	1	1559	1	1704
SGP024	12	24	Partial	PTPd	5.90E-54	118	90	76	82	CAA38068.1	蛋白質子ロンホスファターゼチルタ [Homo sapiens]	1	118	1165	1232

表5は、499の組織および細胞株に由来するcDNAのマイクロアレイを用いて、本発明に開示される選択されたホスファターゼの遺伝子発現を分析した結果を示す。cDNAをナイロン上にスポットし、以下の材料および方法に記載されるように、標識ホスファターゼ遺伝子で探索した。ホスファターゼプローブは、ゲノムのエクソンからPCRクローニングした。データは、左から右に、以下のものを表す："ID": 試料の番号；"試料名"；"T/N", 腫瘍または正常組織；"タイプ", 元の組織；"組織/細胞株", 試料が組織に由来するか培養細胞株に由来するか；"注": 試料についての追加の情報；"処理": 組織または細胞株の化学的または物理学的処理；"p53"は、起源試料におけるp53遺伝子の状態、変異型または野生型を示す。続くカラムにおいて、各遺伝子について、そのSGP番号および配列番号を参照して、標準化した発現値が示されている。表5に示される遺伝子は以下のとおりである：SGP003, SGP060, およびSGP018。探索された組織アレイを含むプロットの画像も含まれる。

【0331】

表5 - 組織アレイ

【表5】

ID	試料名	T/N	タイプ	組織/細胞株	注	処理	p53	ID#NA_4_SGP018	ID#NA_5_SGP003	ID#NA_7_SGP000
7	cerebellum - h	N	神経	組織		なし		736	0	1,824
195	458 medullo mRNA	T	神経	組織		なし		717	2,956	0
11	fetal kidney - h	N	腎臓	組織		なし		708	3,029	341
41	Duodenum - h	N	結腸	組織		なし		633	0	0
8	pituitary gland - h	N	神経	組織		なし		627	2,928	3,003
14	salivary gl. - h	N	唾液腺	組織		なし		608	2,044	193
31	trachea - h	N	気管	組織		なし		580	0	0
44	testis - h	N	精巣	組織		なし		535	0	457
65	HT154	T	HNS	組織		なし		496	1,852	109
185	ACHN	T	腎臓	細胞株	腎臓癌	なし		495	1,114	0
1	adrenal gland - h	N	副腎	組織		なし		470	0	804
10	placenta - h	N	胎盤	組織		なし		459	294	0
28	HPAEC	N	内皮	細胞株	腎近位細管 上皮細胞	なし		458	133	226
6	pancreas - h	N	膵臓	組織		なし		451	1,691	0
377	OVCAR-5 - 7	T	卵巣	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	446	0	0
17	heart - h	N	心臓	組織		なし		447	288,691	426
43	Salivary gl. - h	N	唾液腺	組織		なし		446	0	68
13	fetal liver - h	N	肝臓	組織		なし		437	1,858	0
46	h keratinocytes 2/25/92 #10	T	ケラチノサイト	細胞株		未知		433	434	155
21	liver - h	N	肝臓	組織		なし		408	0	56
23	lung - h	N	肺	組織		なし		406	1,349	0
457	SF-268-6	T	神経	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	405	0	0
38	fetal liver - h	N	肝臓	組織		なし		393	160	41
350	HT29 - 4	T	結腸	細胞株		3mM HU	変異型	393	0	0
26	TCGP	T	精巣	組織		なし		384	831	0
324	Malme-3M	T	腎臓	細胞株	悪性 黒色腫 肺に転移	なし		382	1,223	279
114	SF-539	T	神経	細胞株	神経芽細胞腫	なし		375	0	268
229	HL-60	T	結腸	細胞株	PML 末梢血, 前骨髄球 白血病	なし		358	0	0
30	RPTEC	N	内皮	細胞株	乳上皮細胞	なし		352	5,308	0
375	OVCAR-5 - 6	T	卵巣	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	350	0	0
465	AngioTest1-13	N	HUVEC	細胞株	10nMPDGFc刺激	PDGF		341	0	0
93	HT385	T	肺	組織		なし		339	370	151
111	A549/ATCC	T	肺	細胞株	肺 癌腫	なし		336	2,559	190
423	C33A - 8	T	頸部	細胞株		400 ng/ml noco-48	変異型	333	0	0
45	458 medullo RNA	T	神経	組織		なし		333	0	348
354	HT29 - 6	T	結腸	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	328	0	0
15	fetal lung - h	N	肺	組織		なし		323	4,701	0
483	6	未知	前立腺	未知		未知		321	0	0
143	UO-31	T	腎臓	細胞株		なし		319	0	5
5	brain - h	N	神経	組織		なし		316	0	1,102
468	AngioTest1-3	T	内皮	細胞株	HeLa25X DEF-MES, 低糖素, 4h	25X DEF-MES		304	0	0
98	OVCAR-8	T	卵巣	細胞株		なし		302	340	0
76	HT317	T	肺	組織		なし		300	0	0
258	MDA-N	T	乳	細胞株		なし		298	1,080	0
83	HELA-9h-Q31899	T	内皮	細胞株		なし		294	0	28
223	HT382	T	肺	組織		なし		293	0	282
22	Spleen - h	N	へム	組織		なし		291	3,580	0
25	testis - h	N	精巣	組織		なし		290	0	197
50	HT213	T	腎臓	組織		なし		285	347	0
123	RPMLI 8226	T	白血病	細胞株	多発性骨髄腫	なし		282	0	106
201	stomach - h	N	結腸	組織		なし		282	0	0
490	10	未知	神経	未知	NIH3T3 ベクター	未知		279	0	0
251	HT382-normal	N	肺	組織		なし		279	0	60
378	MCF-7 - 1	T	乳	細胞株	正常/10% FBS	なし	野生型	274	0	0
489	OVCAR-5 - 5	T	卵巣	細胞株		20uM AUR2 阻害剤	変異型	273	0	0
121	HL-60	T	結腸	細胞株	PML 末梢血, 前骨髄球 白血病	なし		273	0	0
323	BioMarker_BS-13	N	内皮	細胞株	HUVEC VEGF+5416 - 24h	VEGF		273	0	0
265	KHOS poly A+	T	骨	細胞株		なし		271	801	83
318	A498	T	腎臓	細胞株	腎臓 癌腫	なし		268	221	0
139	HCT-15	T	結腸	細胞株	結腸 癌腫	なし		267	0	0
426	U2OS - 2	T	骨	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	267	0	0
105	NCH322M	T	肺	細胞株	肺 Br. A. / 肺 気管支肺 癌腫	なし		267	44	58
85	HT146	T	腎臓	組織		なし		266	1,305	0
411	C33A - 2	T	頸部	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	265	0	0
464	AngioTest1-1	T	内皮	細胞株	HeLa25X DEF-MES, 低糖素, 0h	25X DEF-MES		260	0	0
469	21	未知	膵臓	未知	Hu294	未知		258	0	0
254	MDA-MB-435	T	乳	細胞株		なし		254	0	153
82	HT335	T	膵臓	組織		なし		253	0	176
459	SF-268-7	T	神経	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	253	0	0
106	SNB-75	T	神経	細胞株	星状細胞腫	なし		251	655	40
92	HELA-10h-Q31899	T	内皮	細胞株		なし		250	0	0
37	Skeletal muscle - h	N	筋肉	組織		なし		250	0	113
288	HT394	T	肺	組織		なし		242	0	0
319	HT393	T	肺	組織		なし		240	0	106
277	HT338	T	肺	組織		なし		239	82	0

【表6】

237	UC-31	T	腎臓	細胞株		なし		238	0	0
456	EKVX-4	T	肺	細胞株		3mM HU	変異型	237	0	0
382	MCF-7-3	T	乳	細胞株		200uM ミモシン	野生型	236	0	0
410	SW480-6	T	結腸	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	234	0	0
476	AngioTest1-7	N	内皮	細胞株	HUVEC 非刺激/対照	なし		234	0	0
369	SF539-6	T	神経	細胞株		10uM シスプラチン	野生型	234	0	0
379	ADR-RES-5	T	乳	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	232	0	0
74	HT314	Y	MG	組織		なし		225	730	172
151	MCF7	T	乳	細胞株	乳 腺癌, 胸水	なし		225	68	0
436	U2OS-7	T	骨	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	224	0	0
227	MOLT-4	T	白血病	細胞株	ALL 末梢血, 急性リンパ芽球白血病	なし		223	0	0
359	SF539-1	T	神経	細胞株	正常/10% FBS	なし	野生型	222	0	0
412	SW480-7	T	結腸	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	221	0	0
304	HOP-62	T	肺	細胞株	肺 腺癌	なし		219	0	0
29	thyroid gland - h	N	甲状腺	組織		なし		217	383	0
399	HeLa-6	T	内皮	細胞株		400 ng/ml noco-48	HPV E6	215	0	0
146	NCI-H322M	T	肺	細胞株	肺 Br. A / 肺気管支肺癌腫	なし		215	0	38
218	BioMarker_BS-6	N	内皮	細胞株	HUVEC VEGF - 6h	VEGF		213	0	0
4	mammary gland - h	N	乳	組織		なし		213	870	0
305	MDA-MB-231	T	乳	細胞株	乳 腺癌, 胸水	なし		210	403	0
148	NCI-H460	T	肺	細胞株	肺大細胞癌腫	なし		210	0	297
202	Heart - h	N	心臓	組織	h 絨毛癌	なし		208	0	0
80	HT327	T	肺	組織		なし		208	0	0
34	HCAEC	N	内皮	細胞株		なし		207	884	14
104	SNB-19	T	神経	細胞株	神経芽細胞腫	なし		207	0	11
286	HT392	T	肺	組織		なし		205	412	366
312	SW-620	T	結腸	細胞株	結腸 腺癌, リンパ節 転移	なし		204	0	123
491	11	未知	神経	未知	NIH3T3 EWS/FLI1	未知		202	0	0
156	SF-268	T	神経	細胞株	神経芽細胞腫	なし		202	0	157
107	NCI-H460	T	肺	細胞株	肺 大細胞 癌腫	なし		201	0	0
101	NCI-H23	T	肺	細胞株	肺 腺癌	なし		201	0	0
441	WI 38 - 5	N	肺	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	野生型	200	0	0
380	MCF-7-2	T	乳	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	野生型	200	0	0
67	HT169	T	前立腺	組織		なし		200	0	0
118	K-562	T	白血病	細胞株	CML 慢性骨髄性 白血病	なし		199	0	0
403	H1299-6	T	肺	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	199	0	0
310	HCC-2998	T	結腸	細胞株		なし		196	0	0
433	WI 38 - 1	N	肺	細胞株	正常/10% FBS	なし	野生型	196	0	0
53	fetal lung - h	N	肺	組織		なし		196	0	0
314	COLO 205	T	結腸	細胞株	結腸 腺癌	なし		194	0	242
122	SN12C	T	神経	細胞株		なし		194	0	0
453	SF-268-4	T	神経	細胞株		3mM HU	変異型	193	0	0
20	spinal cord - h	N	神経	組織		なし		193	13,667	387
97	HOP-92	T	肺	細胞株	肺 大細胞 癌腫	なし		192	0	365
77	Medulloblastoma #425 11/8	T	神経	組織	h ウイルス腫瘍	なし		190	0	138
259	adrenal gland - h	N	副腎	組織		なし		185	4,748	0
257	Y79 poly A+	T	網膜	細胞株	h 網膜芽細胞腫	なし		185	0	0
79	HELA-2h-031899	T	内皮	細胞株				184	82	191
155	Hs 578T	T	乳	細胞株	腺癌	なし		183	1,362	142
35	Pancreas - h	N	膵臓	組織	h 胚性 口蓋 間葉	なし		183	851	0
55	heart - h	N	心臓	組織		なし		182	2	0
187	UACC-62	T	黒色腫	細胞株		なし		180	311	18
418	H1299-2	T	肺	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	179	0	0
33	uterus - h	N	子宮	組織		なし		179	0	0
216	BioMarker_BS-2	N	内皮	細胞株	HUVEC 対照 - 1h	なし		178	822	197
381	ADR-RES-6	T	乳	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	174	0	0
103	NCI-H226	T	肺	細胞株	肺 扁平上皮癌	なし		173	0	0
269	A+	T	骨	細胞株	h 骨形成性 肉腫, 原発性	なし		172	0	24
63	HT138	T	腎臓	組織		なし		172	0	38
108	U251	T	神経	細胞株	神経芽細胞腫	なし		171	1,326	0
452	EKVX-2	T	肺	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	171	0	0
245	SK-MEL-5	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫, 腋窩節に転移	なし		171	0	62
154	SNB-75	T	神経	細胞株	星状細胞腫	なし		170	168	0
466	AngioTest1-2	T	内皮	細胞株	HeLa25X DEF-MES, 低酸素, 1h	25X DEF-MES		169	0	0
140	SK-MEL-2	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫, 大腿皮膚に転移	なし		168	751	0
442	Hs69-2	N	肺	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	野生型	166	0	0
371	SF539-7	T	神経	細胞株		400 ng/ml noco-24	野生型	166	0	0
275	HT334	T	MG	組織		なし		166	174	0
60	HT170	T	前立腺	組織		なし		164	0	0
h fibroblasts 3/31/92										
263	#12	T	繊維芽細胞	細胞株	眼窩上顎域に転移	未知		164	756	117
416	H1299-1	T	肺	細胞株	正常/10% FBS	なし	変異型	163	0	0
493	Prostate_sampleMG-13	未知	神経	細胞株	TC-71 ユーイング腫瘍由来細胞株	なし		162	0	0
144	SK-MEL-28	T	黒色腫	細胞株	悪性黒色腫	なし		158	0	0
126	Caki-1	T	腎臓	細胞株	明細胞癌腫, 腎臓 原発性, 皮膚に転移	なし		157	296	0

【表7】

326	Hs 578T	T	乳	細胞株	腺管癌	なし		155	0	0
470	AngioTest1-4	T	肝臓	細胞株	HepG2 25X DEF-MES, 低酸素, 0h	25X DEF-MES		155	0	0
81	HELA-4h-031899	T	内皮	細胞株				155	739	0
492	Prostate_sampleMG-12	未知	神経	細胞株	TC-32 ユーイング腫瘍由来細胞株	なし		152	0	0
281	pituitary gland - h	N	神経	組織		なし		151	0	218
404	SW480 - 3	T	結腸	細胞株		200uM ミモシン	変異型	151	0	0
135	SW-620	T	結腸	細胞株	結腸 腺癌, リンパ節 転移	なし		151	52	318
181	KB poly A+	T	未知	細胞株	h 類表皮癌			148	0	0
357	HT29 - 8	T	結腸	細胞株		400 ng/ml noco-48	変異型	148	0	0
451	SF-268-3	T	神経	細胞株		200uM ミモシン	変異型	147	0	0
116	CCRF-CEM	T	白血病	細胞株	ALL 急性 リンパ芽球 白血病	なし		147	1,543	202
70	HT190	T	腎臓	組織		なし		147	676	0
290	HT312	T	肺	組織		なし		144	0	31
215	HT371	T	肺	組織		なし		144	75	98
308	PC-3	T	前立腺	細胞株	前立腺 癌腫	なし		144	139	0
372	OVCAR-5 - 4	T	卵巣	細胞株		3mM HU	変異型	142	0	0
32	HMEC	N	内皮	細胞株	冠状動脈 内皮細胞	なし		140	986	0
197	fetal brain - h	N	神経	組織		なし		140	0	0
222	BioMarker_BS-8	N	内皮	細胞株	HUVEC 5416 - 1h	SU5416		138	191	0
296	HT162	T	卵巣	組織		なし		137	0	0
2	lymph node - h	N	へム	組織		なし		136	3,663	323
307	PT cells poly A+	T	未知	細胞株		なし		133	0	66
478	AngioTest1-8	N	内皮	細胞株	HUVEC 10mn VEGFで刺激	VEGF		133	0	0
358	OVCAR-4 - 4	T	卵巣	細胞株		3mM HU	野生型	133	0	0
19	kidney - h	N	腎臓	組織		なし		131	2,148	55
145	UACC-62	T	黒色腫	細胞株		なし		130	0	42
261	neruoblastoma RNA	T	神経	組織		なし		129	0	395
388	MCF-7 - 6	T	乳	細胞株		10uM シスプラチン	野生型	128	0	0
165	Caki-1	T	腎臓	細胞株	明細胞癌腫, 腎臓 原発性, 皮膚に転移	なし		128	134	252
313	HT192	T	MG	組織		なし		127	656	290
395	HeLa - 6	T	内皮	細胞株		10uM シスプラチン	HPV E6	127	0	0
24	stomach - h	N	結腸	組織		なし		124	4,601	47
295	458.medullo RNA	T	神経	組織		なし		124	0	0
337	AS49 - 4	T	肺	細胞株		3mM HU	野生型	124	0	0
115	OVCAR-3	T	卵巣	細胞株	卵巣 腺癌	なし		124	959	0
225	BioMarker_BS-11	N	内皮	細胞株	HUVEC VEGF+5416 - 1h	VEGF		123	0	0
325	HT395	T	肺	組織		なし		121	0	184
162	DU-145	T	前立腺	細胞株	前立腺 癌腫	なし		117	0	15
128	RXF 393	T	腎臓	細胞株		なし		117	212	295
407	H1299 - 8	T	肺	細胞株		400 ng/ml noco-48	変異型	116	0	0
455	SF-268-5	T	神経	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	116	0	0
360	OVCAR-4 - 5	T	卵巣	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	野生型	115	0	0
243	SK-MEL-2	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫, 大腿皮膚に転移	なし		113	408	119
199	placenta - h	N	胎盤	組織		なし		113	481	139
221	HT372-normal	N	肺	組織		なし		111	0	59
334	HCT-116 - 4	T	結腸	細胞株		3mM HU	野生型	110	0	0
247	SK-MEL-28	T	黒色腫	細胞株	悪性黒色腫	なし		109	255	0
125	SR	T	白血病	細胞株	大細胞 白血病	なし		108	0	0
333	AS49 - 2	T	肺	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	野生型	107	0	0
477	3	未知	前立腺	未知		未知		106	0	0
271	MK poly A+	T	未知	未知		未知		105	244	266
207	CRL1441 + TPA (24h) 8/30	T	腎臓	細胞株	h 肺, 胚性	TPA		104	798	0
87	HT348	T	前立腺	組織		なし		103	1,459	0
472	AngioTest1-5	T	肝臓	細胞株	HepG2 25X DEF-MES, 低酸素, 1h	25X DEF-MES		102	0	0
385	ADR-RES - 8	T	乳	細胞株		400 ng/ml noco-48	変異型	102	0	0
406	SW480 - 4	T	結腸	細胞株		3mM HU	変異型	101	0	0
59	lung - h	N	肺	組織		なし		100	0	123
160	CCRF-CEM	T	白血病	細胞株	ALL 急性 リンパ芽球 白血病	なし		100	0	0
301	lymph node - h	N	へム	組織		なし		100	0	144
152	SNB-19	T	神経	細胞株	神経芽細胞腫	なし		100	0	324
454	EKVX - 3	T	肺	細胞株		200uM ミモシン	変異型	98	0	0
383	ADR-RES - 7	T	乳	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	97	0	0
322	TK-10	T	腎臓	細胞株		なし		97	0	167
408	SW480 - 5	T	結腸	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	97	0	0
356	OVCAR-4 - 3	T	卵巣	細胞株		200uM ミモシン	野生型	97	0	0
18	small intestine - h	N	結腸	組織		なし		96	4,224	0
460	EKVX - 1	T	肺	細胞株	正常/10% FBS	なし	変異型	96	0	0
113	HOP-62	T	肺	細胞株	肺 腺癌	なし		95	0	0
321	BioMarker_BS-12	N	内皮	細胞株	HUVEC VEGF+5416 - 6h	VEGF		95	389	175
274	testis - h	N	精巣	組織		なし		94	0	0
173	WI-38 72h	N	肺	細胞株		未知		94	310	18

【表 8】

458	EKVX-8	T	肺	細胞株	400 ng/ml noco-48	変異型	94	0	0	
409	C33A-1	T	頸部	細胞株	正常/10% FBS	変異型	94	0	0	
198	HCAEC	N	内皮	細胞株	なし		94	0	0	
95	HT308	T	MG	組織	なし		94	0	0	
302	RPTEC	N	内皮	細胞株	乳上皮細胞	なし	94	398	0	
330	HT218-normal	N	肺	組織	なし		93	0	57	
467	2D	未知	脾臓	未知	Hu71	未知	92	0	0	
124	A498	T	腎臓	細胞株	腎臓癌腫	なし	91	0	0	
335	A549-3	T	肺	細胞株	200uM ミモシン	野生型	90	0	0	
36	lymph node - h	N	へム	組織	なし		90	636	0	
182	HEPM 3d TGFβ1 detergent+DNase	N	口蓋	細胞株	TGFβ1 界面活性剤+DNase		90	0	0	
16	skeletal muscle - h	N	筋肉	組織	なし		89	3,018	826	
272	Spleen - h	N	へム	組織	なし		89	0	205	
132	786-0	T	腎臓	細胞株	原発性腎臓細胞腺癌	なし	89	0	87	
40	thymus.h	N	へム	組織	なし		88	1,145	259	
387	HeLa-1	T	内皮	細胞株	正常/10% FBS	なし	HPV E6	88	0	0
349	EKVX-6	T	肺	細胞株	10uM シスプラチン	変異型	87	0	0	
56	HT155	T	肺	組織	なし		85	607	108	
396	ADR-RES-2	T	乳	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	84	0	0
473	1	未知	前立腺	未知	未知		82	0	0	
127	DU-145	T	前立腺	細胞株	前立腺癌腫	なし	82	0	107	
287	trachea - h	N	気管	組織	なし		80	0	46	
309	brain -h	N	神経	組織	なし		79	58	314	
270	spinal cord - h	N	神経	組織	なし		78	0	71	
236	OVCAR-4	T	卵巣	細胞株	なし		76	0	9	
449	SF-268-2	T	神経	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	76	0	0
189	MCF-7/ADR-RES	T	乳	細胞株	なし		74	0	0	
192	Duodenum - h	N	結腸	組織	なし		74	0	0	
362	OVCAR-4 - 6	T	卵巣	細胞株	10uM シスプラチン	野生型	74	0	0	
71	HT145	T	MG	組織	なし		72	639	0	
239	SN12C	T	神経	細胞株	なし		71	0	120	
428	U2OS-3	T	骨	細胞株	200uM ミモシン	変異型	71	0	0	
190	Skeletal muscle - h	N	筋肉	組織	なし		70	0	0	
183	HOS poly A+	T	骨	細胞株	h 骨形成性肉腫	なし	69	0	0	
298	HT398-normal	N	肺	組織	なし		69	0	208	
241	LOX IMVI	T	黒色腫	細胞株	メラニン欠乏黒色腫	なし	67	0	66	
475	2	未知	前立腺	未知	未知		66	0	0	
153	MCF-7/ADR-RES	T	乳	細胞株	なし		66	0	206	
138	MaIme-3M	T	腎臓	細胞株	悪性黒色腫、肺に転移	なし	65	104	0	
90	HELA-8h-031899	T	内皮	細胞株	なし		63	1,319	0	
62	HT172	T	卵巣	組織	なし		63	0	274	
388	MCF-7-5	T	乳	細胞株	2uM AUR2 阻害剤	野生型	62	0	0	
47	#17	T	smc	細胞株	未知		62	885	0	
497	17	T	前立腺	組織	転移	なし	62	0	0	
402	SW480-2	T	結腸	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	62	0	0
398	ADR-RES-3	T	乳	細胞株	200uM ミモシン	変異型	61	0	0	
141	KM-12	T	結腸	細胞株	なし		60	252	428	
188	Pancreas - h	N	膵臓	組織	h 胚性口蓋間葉	なし	59	177	0	
276	HTB36 24h TPA RNA 6/23	T	未知	細胞株	h 肺、二倍体	TPA	59	0	174	
204	HT307	T	MG	組織	なし		58	0	41	
297	thymus.h	N	へム	組織	なし		56	2,879	0	
129	PC-3	T	前立腺	細胞株	前立腺腺癌	なし	55	22	42	
66	HT180	T	肺	組織	なし		54	0	0	
167	T-47D	T	乳	細胞株	なし		54	1,052	255	
69	HT143	T	内皮	組織	なし		54	0	117	
120	MOLT-4	T	白血病	細胞株	ALL 末梢血、急性リンパ芽腫白血病	なし	52	146	723	
158	SF-295	T	神経	細胞株	なし		51	0	206	
462	OVCAR-5-8	T	卵巣	細胞株	400 ng/ml noco-48	変異型	50	0	0	
214	BioMarker_BS-1	N	内皮	細胞株	HUVEC 対照 - 0h	なし	50	534	0	
61	lymph node - h	N	へム	組織	なし		50	1,068	219	
366	OVCAR-5-1	T	卵巣	細胞株	正常/10% FBS	なし	48	0	0	
75	CRL1572 3/17/89	T	卵巣	細胞株	なし		47	40	0	
361	SF539-2	T	神経	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	野生型	47	0	0
166	786-0	T	腎臓	細胞株	原発性腎臓細胞腺癌	なし	45	791	301	
9	fetal brain - h	N	神経	組織	なし		42	6,215	1,666	
306	U251	T	神経	細胞株	神経膠芽細胞腫	なし	42	294	188	
27	thymus -h	N	へム	組織	なし		42	679	0	
68	HT189	T	卵巣	組織	なし		41	0	0	
119	OVCAR-5	T	卵巣	細胞株	なし		41	6	0	
495	Prostate_sampleMG-15	未知	神経	未知	ES10 原発性ユークイング腫瘍	未知	40	0	0	
51	fetal liver- h	N	肝臓	組織	なし		38	28	0	
169	Ken-3	T	肺	細胞株	A549+50ng/ml HGF - 6h	HGF	38	0	218	
57	kidney - h	N	腎臓	組織	なし		37	0	0	
279	mammary gland - h	N	乳	組織	なし		37	0	50	
130	ACHN	T	腎臓	細胞株	腎臓腺癌	なし	37	0	107	
136	LOX IMVI	T	黒色腫	細胞株	メラニン欠乏黒色腫	なし	36	911	92	
52	HT288	T	膵臓	組織	なし		35	479	189	
64	HT178	T	内皮	組織	なし		34	714	0	
278	bladder - h	N	尿	組織	なし		34	2,586	0	

【表9】

338	HCT-116 - 6	T	結腸	細胞株		10uM シスプラチン	野生型	33	0	0
384	MCF-7 - 4	T	乳	細胞株		3mM HU	野生型	32	0	0
196	HMEC	N	内皮	細胞株	冠状動脈内皮細胞	なし		32	1,000	0
250	M14	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫	なし		32	0	0
294	HT347	T	前立腺	組織		なし		30	755	0
320	RXF 393	T	腎臓	細胞株		なし		30	586	259
78	HT323	T	MG	組織		なし		28	0	0
474	AngioTest1-6	T	肝臓	細胞株	HepG2 25X DEF-MES, 低酸素, 4h	25X DEF-MES		28	0	0
300	#17	T	smc	細胞株		未知		27	0	290
328	HT157-normal	N	肺	組織		なし		27	57	133
427	Hs68 - 6	N	肺	細胞株		10uM シスプラチン	野生型	26	0	0
413	C33A - 3	T	頸部	細胞株		200uM ミモシン	変異型	25	0	0
264	prostate, h	N	前立腺	組織		なし		25	675	493
66	HELA-0h-031899	T	内皮	細胞株		なし		24	410	0
342	HCT-116 - 8	T	結腸	細胞株		400 ng/ml noco-48	野生型	22	0	0
425	U2OS - 1	T	骨	細胞株	正常/10% FBS	なし	変異型	22	0	0
91	HT378	T	肺	組織		なし		21	0	0
435	WI 38 - 2	N	肺	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	野生型	21	0	0
303	NCI-H226	T	肺	細胞株	肺扁平上皮癌	なし		21	0	0
209	bladder - h	N	尿	組織		なし		19	0	0
373	SF539 - 8	T	神経	細胞株		400 ng/ml noco-48	野生型	18	0	0
228	EKVX	T	肺	細胞株	肺腺癌	なし		17	752	0
364	OVCAR-4 - 7	T	卵巣	細胞株		400 ng/ml noco-24	野生型	15	0	0
440	Hs68 - 1	N	肺	細胞株	正常/10% FBS	なし	野生型	14	0	0
461	SF-268-8	T	神経	細胞株		400 ng/ml noco-48	変異型	13	0	0
283	salivary gl. - h	N	唾液腺	組織		なし		13	469	0
424	H1299 - 5	T	肺	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	13	0	0
133	HCT 116	T	結腸	細胞株	結腸癌腫	なし		12	0	138
205	3/21/88	N	肺	細胞株		なし		12	0	110
208	Ken-1	T	肺	細胞株	A549+50ng/ml HGF - 0h	なし		12	0	0
240	OVCAR-8	T	卵巣	細胞株		なし		12	0	173
72	HT227	T	腎臓	組織		なし		11	0	0
401	SW480 - 1	T	結腸	細胞株	正常/10% FBS	なし	変異型	11	0	0
370	OVCAR-5 - 3	T	卵巣	細胞株		200uM ミモシン	変異型	10	0	0
291	HEPM 3d untreated	N	肺動脈	細胞株	肺動脈内皮細胞	なし		9	630	11
420	H1299 - 3	T	肺	細胞株		200uM ミモシン	変異型	8	0	0
479	4	未知	前立腺	未知		未知		7	0	0
273	liver - h	N	肝臓	組織		なし		6	0	110
329	HT213-normal	N	腎臓	組織		なし		5	279	0
392	MCF-7 - 8	T	乳	細胞株		400 ng/ml noco-48	野生型	5	0	0
180	thymus -h	N	へム	組織		なし		5	62	0
268	small intestine - h	N	結腸	組織		なし		4	0	0
486	AngioTest1-12	N	内皮	細胞株	HUVEC 30mn bFGF刺激	bFGF		2	0	0
355	HT29 - 7	T	結腸	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	2	0	0
485	8	未知	前立腺	未知		未知		1	0	0
12	prostate, h	N	前立腺	組織		なし		0	4,960	699
176	HT398	T	肺	組織		なし		0	0	590
232	A549ATCC	T	肺	細胞株	肺癌腫	なし		0	3,434	572
159	MDA-MB-435	T	乳	細胞株		なし		0	0	561
234	OVCAR-3	T	卵巣	細胞株	卵巣腺癌	なし		0	0	470
317	HT151	T	肺	組織		なし		0	1,571	439
164	HCT 116	T	結腸	細胞株	結腸癌腫	なし		0	895	403
142	SK-MEL-5	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫, 腋窩節に転移	なし		0	0	318
117	OVCAR-4	T	卵巣	細胞株		なし		0	0	308
54	HT139	T	内皮	組織		なし		0	0	302
137	COLO 205	T	結腸	細胞株	結腸腺癌	なし		0	232	297
179	HT372	T	肺	組織		なし		0	644	275
49	fetal kidney - h	N	腎臓	組織		なし		0	0	262
102	SK-OV-3	T	卵巣	細胞株	卵巣腺癌, 悪性腹水	なし		0	0	254
h keratinocytes	2/25/92 #10	T	ケラチノサイト	細胞株	h 神経芽細胞腫	未知		0	0	252
110	SF-268	T	神経	細胞株	神経芽細胞腫	なし		0	0	252
206	WI-38 72h 0.5%FBS, 24h 10% FBS	T	肺	細胞株	0.5%FBS, 24h 10% FBS	low serum		0	74	208
99	EKVX	T	肺	細胞株	肺腺癌	なし		0	0	180
163	T-47D	T	乳	細胞株		なし		0	1,556	172
94	HELA-11h-031899	T	内皮	細胞株		なし		0	977	170
157	MDA-MB-231	T	乳	細胞株	Brest 腺癌, 胸水	なし		0	0	142
39	Heart - h	N	心臓	組織	h 絨毛癌	なし		0	0	116
171	BioMarker_BS-5	N	内皮	細胞株	HUVEC VEGF - 1h	VEGF		0	95	116
184	Salivary gl. - h	N	唾液腺	組織		なし		0	0	104
233	SR1	T	白血病	細胞株	大細胞 白血病	なし		0	0	93
282	prostate, h	N	前立腺	組織		なし		0	0	89
289	uterus - h	N	子宮	組織		なし		0	0	85
178	HT281	T	MG	組織		なし		0	0	81
170	BioMarker_BS-3	N	内皮	細胞株	HUVEC 対照 - 6h	なし		0	434	79
262	HTB10	T	神経	細胞株	h 卵巣奇形性胎嚢水細胞	なし		0	0	77

【表10】

168	HT311	T	MG	組織		なし		0	0	75
194	TCGP	T	精巣	組織		なし		0	0	67
248	K-562	T	白血病	細胞株	CML 慢性骨髄性白血病	なし		0	0	67
244	SK-OV-3	T	卵巣	細胞株	卵巣 腺癌, 悪性腹水	なし		0	0	62
193	A+	T	未知	細胞株	h 羊膜, HeLa マーカー	なし		0	409	60
149	M14	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫	なし		0	2,528	58
112	SF-295	T	神経	細胞株		なし		0	463	56
327	HT157	T	肺	組織		なし		0	0	52
284	HELA-EXP-031899	T	内皮	細胞株				0	0	48
48	#12	T	繊維芽細胞	細胞株	眼窩上領域に転移	未知		0	0	36
161	MDA-N	T	乳	細胞株		なし		0	0	35
252	MCF7	T	乳	細胞株	乳 腺癌, 胸水	なし		0	0	23
88	HELA-6h-031899	T	内皮	細胞株				0	719	21
58	HT183	T	卵巣	組織		なし		0	270	19
172	BioMarker_BS-9	N	内皮	細胞株	HUVEC 5416 - 6h	SU5416		0	0	14
73	HT302	T	膵臓	組織		なし		0	0	4
3	bone marrow - h	N	骨	組織		なし		0	2,984	0
175	DNase	T	未知	細胞株		なし		0	1,604	0
285	thyroid gland - h	N	甲状腺	組織		なし		0	1,301	0
210	Ken-2	T	肺	細胞株	A549+50ng/ml HGF - 1h	HGF		0	903	0
235	HCT-15	T	結腸	細胞株	結腸 腺癌	なし		0	680	0
84	BioMarker_BS-4	N	内皮	細胞株	HUVEC 対照 - 24h	なし		0	601	0
293	HTB36 0h RNA	T	未知	細胞株		なし		0	572	0
316	KM-12	T	結腸	細胞株		なし		0	511	0
203	HT160	T	肺	組織		なし		0	502	0
266	skkeletal muscle - h	N	筋肉	組織		なし		0	423	0
258	HPAEC	N	内皮	細胞株	腎近位細管 上皮細胞	なし		0	420	0
109	NCI-H522	T	肺	細胞株	肺 腺癌	なし		0	413	0
200	fetal liver - h	N	肝臓	組織		なし		0	234	0
174	CRIL1441 RNA 8/30	T	腎臓	細胞株		なし		0	171	0
253	HT392-normal	N	肺	組織		なし		0	167	0
267	MNNG-OS poly A+	T	骨	細胞株	h 骨肉腫, chem. transf.	なし		0	45	0
213	HT370	T	肺	組織		なし		0	16	0
280	pancreas - h	N	膵臓	組織		なし		0	0	0
389	HeLa - 3	T	内皮	細胞株		200uM ミモシン	HPV E6	0	0	0
391	HeLa - 4	T	内皮	細胞株		3mM HU	HPV E6	0	0	0
393	HeLa - 5	T	内皮	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	HPV E6	0	0	0
397	HeLa - 7	T	内皮	細胞株		400 ng/ml noco-24	HPV E6	0	0	0
463	HeLa - 2	T	内皮	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	HPV E6	0	0	0
344	HT29 - 1	T	結腸	細胞株	正常/10% FBS	なし	変異型	0	0	0
346	HT29 - 2	T	結腸	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	0	0	0
347	EKVX - 5	T	肺	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	0	0	0
348	HT29 - 3	T	結腸	細胞株		200uM ミモシン	変異型	0	0	0
351	EKVX - 7	T	肺	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	0	0	0
352	HT29 - 5	T	結腸	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	0	0	0
368	OVCAR-5 - 2	T	卵巣	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	変異型	0	0	0
394	ADR-RES - 1	T	乳	細胞株	正常/10% FBS	なし	変異型	0	0	0
400	ADR-RES - 4	T	乳	細胞株		3mM HU	変異型	0	0	0
405	H1299 - 7	T	肺	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	0	0	0
414	SW480 - 8	T	結腸	細胞株		400 ng/ml noco-48	変異型	0	0	0
415	C33A - 4	T	頸部	細胞株		3mM HU	変異型	0	0	0
417	C33A - 5	T	頸部	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	0	0	0
419	C33A - 6	T	頸部	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	0	0	0
421	C33A - 7	T	頸部	細胞株		400 ng/ml noco-24	変異型	0	0	0
422	H1299 - 4	T	肺	細胞株		3mM HU	変異型	0	0	0
430	U2OS - 4	T	骨	細胞株		3mM HU	変異型	0	0	0
432	U2OS - 5	T	骨	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	変異型	0	0	0
434	U2OS - 6	T	骨	細胞株		10uM シスプラチン	変異型	0	0	0
438	U2OS - 8	T	骨	細胞株		400 ng/ml noco-48	変異型	0	0	0
448	SF-268-1	T	神経	細胞株	正常/10% FBS	なし	変異型	0	0	0
331	A549 - 1	T	肺	細胞株	正常/10% FBS	なし	野生型	0	0	0
332	HCT-116 - 3	T	結腸	細胞株		200uM ミモシン	野生型	0	0	0
336	HCT-116 - 5	T	結腸	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	野生型	0	0	0
339	A549 - 5	T	肺	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	野生型	0	0	0
340	HCT-116 - 7	T	結腸	細胞株		400 ng/ml noco-24	野生型	0	0	0
341	A549 - 6	T	肺	細胞株		10uM シスプラチン	野生型	0	0	0
343	A549 - 7	T	肺	細胞株		400 ng/ml noco-24	野生型	0	0	0
345	A549 - 8	T	肺	細胞株		400 ng/ml noco-48	野生型	0	0	0
363	HCT-116 - 1	T	結腸	細胞株	正常/10% FBS	なし	野生型	0	0	0
363	SF539 - 3	T	神経	細胞株		200uM ミモシン	野生型	0	0	0
365	SF539 - 4	T	神経	細胞株		3mM HU	野生型	0	0	0

【表 11】

367	SF539-5	T	神経	細胞株		2uM AUR2 阻害剤	野生型	0	0	0
374	OVCAR-4-1	T	卵巣	細胞株	正常/10% FBS	なし	野生型	0	0	0
376	OVCAR-4-2	T	卵巣	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	野生型	0	0	0
390	MCF-7-7	T	乳	細胞株		400 ng/ml noco-24	野生型	0	0	0
429	Hs68-7	N	肺	細胞株		400 ng/ml noco-24	野生型	0	0	0
431	Hs68-8	N	肺	細胞株		400 ng/ml noco-48	野生型	0	0	0
437	WI 38-3	N	肺	細胞株		200uM ミモシン	野生型	0	0	0
439	WI 38-4	N	肺	細胞株		3mM HU	野生型	0	0	0
443	WI 38-6	N	肺	細胞株		10uM シスプラチン	野生型	0	0	0
444	Hs68-3	N	肺	細胞株		200uM ミモシン	野生型	0	0	0
445	WI 38-7	N	肺	細胞株		400 ng/ml noco-24	野生型	0	0	0
446	Hs68-4	N	肺	細胞株		3mM HU	野生型	0	0	0
447	WI 38-8	N	肺	細胞株		400 ng/ml noco-48	野生型	0	0	0
460	HCT-116-2	T	結腸	細胞株	低血清/0.1%FBS	低血清	野生型	0	0	0
488	OVCAR-4-8	T	卵巣	細胞株		400 ng/ml noco-48	野生型	0	0	0
42	Fetal brain - h	N	神経	組織		なし		0	0	0
89	HT368	T	肺	組織		なし		0	0	0
96	HELA-12h-031899	T	内皮	細胞株				0	0	0
100	IGROV1	T	卵巣	細胞株		なし		0	0	0
131	HCC-2998	T	結腸	細胞株		なし		0	0	0
134	TK-10	T	腎臓	細胞株		なし		0	0	0
147	UACC-257	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫	なし		0	0	0
150	NCI-H522	T	肺	細胞株	肺 腺癌	なし		0	0	0
177	HT140	T	腎臓	組織		なし		0	0	0
186	testis - h	N	精巣	組織		なし		0	0	0
191	a+	T	骨	細胞株		なし		0	0	0
211	HT369	T	肺	組織		なし		0	0	0
212	Ken-4	T	肺	細胞株	A549+50ng/ml HGF - 24h	HGF		0	0	0
217	HT377	T	肺	組織		なし		0	0	0
220	BioMarker_BS-7	N	内皮	細胞株	HUVEC VEGF - 24h	VEGF		0	0	0
224	BioMarker_BS-10	N	内皮	細胞株	HUVEC 5416 - 24h	SU5416		0	0	0
226	HOP-92	T	肺	細胞株	肺 大細胞 癌腫	なし		0	0	0
230	NCI-H23	T	肺	細胞株	肺 腺癌	なし		0	0	0
231	RPMI 8226	T	白血病	細胞株	多発性骨髄腫	なし		0	0	0
238	OVCAR-5	T	卵巣	細胞株		なし		0	0	0
242	IGROV1	T	卵巣	細胞株		なし		0	0	0
246	SF-539	T	神経	細胞株	神経膠芽細胞腫	なし		0	0	0
249	UACC-257	T	黒色腫	細胞株	悪性 黒色腫	なし		0	0	0
255	HT279	T	MG	組織		なし		0	0	0
260	bone marrow - h	N	へム	組織		なし		0	0	0
292	HT149 - normal	N	肺	組織		なし		0	0	0
299	Fetal brain - h	N	神経	組織		なし		0	0	0
311	cerebellum - h	N	神経	組織		なし		0	0	0
315	HT218	T	肺	組織		なし		0	0	0
471	22	未知	膵臓	未知	Hu399	未知		0	0	0
480	AngioTest1-9	N	内皮	細胞株	HUVEC 30mn VEGFで刺激	VEGF		0	0	0
481	5	未知	前立腺	未知	未知	未知		0	0	0
482	AngioTest1-10	N	内皮	細胞株	HUVEC 30mn PDGFで刺激	PDGF		0	0	0
484	AngioTest1-11	N	内皮	細胞株	HUVEC 10mn bFGFで刺激	bFGF		0	0	0
487	9	未知	前立腺	未知	未知	未知		0	0	0
494	Prostata_sampleMG-14	未知	神経	未知	ES7 原発性ニューイング腫瘍	未知		0	0	0
496	116	T	前立腺	組織	転移	未知		0	0	0
498	118	T	前立腺	組織	転移	未知		0	0	0
499	119	T	前立腺	組織	転移	未知		0	0	0

【0332】

表6の"多組織プロット"は、Clontech Multiple Tissue BlotをSGP002およびSGP012に由来する放射性標識プローブで探索した結果を含む。表には、プロット上の組織および各組織における相対的遺伝子発現について得られた値が示される。

【0333】

表6 - 多組織プロット

【表12】

組織	ID#NA11_SGP012	ID#NA2_SGP002
全脳	1244	14946
小脳, 左	3610	22681
黒質	0	14730
心臓	0	14816
食道	2008	15554
結腸, 横向	1607	20564
腎臓	44	25345
肺	637	27317
肝臓	68	37568
白血病, HL-60	0	2204
胎児脳	0	7572
大脳皮質	1178	16874
小脳, 右	5201	35351
側位核	0	14985
大動脈	203	13539
胃	0	22332
結腸, 下向	3812	16311
骨格筋	220	20600
胎盤	497	64169
脾臓	264	19531
HeLa S3	0	20564
胎児心臓	649	15777
前頭葉	0	11984
脳梁	1972	27350
視床	789	22702
房, 左	465	14405
十二指腸	695	20940
直腸	0	12642
脾臓	0	18882
膀胱	528	22077
副腎	570	138400
白血病, K562	0	7331
胎児腎臓	620	38826
頭頂葉	492	21242
扁桃	830	14740
下垂体	1620	41283
房, 右	754	8285
jujenum	2358	21596
胸腺	54	29593
子宮	1427	18077
甲状腺	65	25540
白血病, MOLT-4	92	8081
胎児肝臓	1189	29080
後頭葉	449	17070
尾状核	334	22638
脊髄	556	6385
心室, 左	0	9420
回腸	1002	15704
末梢血リンパ球	1435	15521
前立腺	0	46589
唾液腺	741	45205
パーキットリンパ腫, Raji	0	2497
胎児脾臓	0	24452
側頭葉	913	15048
海馬	608	13826
心室, 右	811	9938
回盲部	0	18970
リンパ節	3497	23227
精巣	10751	33336
乳腺	2429	43077
パーキットリンパ腫, Daudi	2439	2384
胎児胸腺	797	31519
中心後回大脳皮質	0	16294
延髄	730	18935
心室間中隔	0	18269
垂	0	23931
骨髄	1127	10289
卵巣	437	7103
結腸直腸腺癌, SW480	466	15172
胎児肺	1	26587
脳橋	875	12156
被殻	0	27800
心臓尖	311	9897
結腸, 上向	1409	12683
気管	1894	22056
肺癌腫, A549	1276	15151

実施例

以下の実施例は限定ではなく、本発明の種々の観点および特徴の代表的なものにすぎない。以下の実施例は、本発明のセリン/トレオニンホスファターゼの単離および特徴付けを示す。

【0335】

実施例1：ゲノムDNAからの蛋白質ホスファターゼ遺伝子の同定および特徴付け

材料および方法

新規ホスファターゼは、Celeraヒトゲノム配列データベースから、および公共のHuman Genome Sequencing project (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から、隠れマルコフモデル(HMMR)を用いて同定した。ゲノムデータベース登録物は、6つのオープンリーディングフレームに翻訳し、HMMR2.1のフィールドプログラム可能アレイ(FPGA)加速版を有するTimeLogic Decypherボックスを用いて、モデルに対してこれらを検索した。HMMRプロファイルに対してアラインメントした、予測された蛋白質配列をコードするDNA配列を、元のゲノムデータベースから抽出した。次に、核酸配列をPangea Clusteringツールを用いてクラスター化し、反復登録物を排除した。次に推定蛋白質ホスファターゼ配列を一連のクエリーおよびフィルターを通して順番に走らせて、新規蛋白質ホスファターゼ配列を同定した。特に、HMMRで同定された配列は、BLASTNおよびBLASTXを用いて、既知のヒト蛋白質ホスファターゼおよびすべてのその後の新規蛋白質ホスファターゼ配列をそれが同定されるにつれて含有するヌクレオチドおよびアミノ酸レポジトリに対して検索した。出力はスプレッドシートで表示して、手動検査で既知の遺伝子を排除することを容易にした。2つのモデル、すなわち、"完全"モデルおよび"部分"またはスミス・ウォーターマンモデルを開発した。部分モデルを用いて準触媒的ホスファターゼドメインを同定し、完全モデルを用いて完全触媒ドメインを同定した。次に選択したヒットをBLASTNを用いて公共nrnaおよびESTデータベースに対してクエリーを行い、これらが実際にユニークであることを確認した

。場合によっては、新規遺伝子は、先に同定されている齧歯類または脊椎動物蛋白質ホスファターゼのオルトログであると判定された。

【0336】

仮出願に置いて出願された配列の多くは、全コーディング配列を含んでいなかった。部分DNA配列の延長による全長オープンリーディングフレームの包含は、いくつかの方法により行った。表7に示されるcDNAデータベースを繰り返してblastn検索して、ゲノム配列を延長したcDNAを見いだした。"LifeSeqGold"データベースはIncyte Genomics, Inc (<http://www.incyte.com/>)から入手した。NCBIデータベースはNational Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から入手した。すべてのblastn検索は、ヌクレオチドミスマッチについてのペナルティ-3、およびヌクレオチドマッチのリワード1を用いて行った。ギャップ付きblastアルゴリズムは以下に記載されている(Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402)。

【0337】

部分DNA配列の伸長による全長オープンリーディングフレームの包含はまた、ゲノムデータベースの検索の繰り返しにより行った。第1の方法は、スミス-ウォーターマンアルゴリズムを用いて、最も近い蛋白質ホモログまたはオルトログを部分配列に対して蛋白質-蛋白質検索を行った。標的データベースは、Genescanおよびヒトゲノムプロジェクト(HGP)ならびにCeleraから得られた全ヒトゲノム配列のオープンリーディングフレーム(ORF)予測からなる。検索したゲノムデータベースの完全なセットは以下の表8に示される

。潜在的な延長をコードするゲノム配列は、NCBI非重複データベースに対するblastx分析を行ってヒットの新規性を確認することによりさらに評価した。延長するゲノム配列は、DNASTarのSeqmanプログラムを用いて潜在的イントロンを削除した後にcDNA配列中に組み込んだ。スミス-ウォーターマン検索について用いたデフォルトのパラメータは以下のとおりである。マトリクス：blosum62；ギャップオープニングペナルティー：12；ギャップ延長ペナルティー：2。Genescan予測は、Genescanプログラムを、Chris Burge and Sam Karlin ("Prediction of Complete Gene Structures in Human Genomic DNA", JMB (1997) 268 (1) : 78 - 94) に詳細が記載されるように用いて行った。ゲノムDNAからのORFの予測は、標準的な6フレーム翻訳を用いて行った。

【0338】

ゲノム配列からDNA伸長を規定する別の方法は、Genescanプログラムを用いてゲノムデータベースを繰り返し検索してエクソンプライシングを予測した。次にこれらの予測された遺伝子を、関連するホスファターゼに対するホモロジーに基づいてこれらが部分遺伝子の"本物の"延長であるかを見ることにより評価した。

【0339】

別の方法は、Genewiseプログラム(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Wise2/>)を使用して、最も近いオルトログ/ホモログに対するホモロジーに基づいて潜在的ORFを予測することを含む。Genewiseは、2つの入力、すなわち相同の蛋白質と目的とする遺伝子を含むゲノムDNAを必要とする。ゲノムDNAはCeleriaおよびヒトゲノムプロジェクトのデータベースのblastn検索により同定した。オルトログは、NCBI非重複蛋白質データベース(NRAA)をblastp検索することにより同定した。Genewiseは、蛋白質配列をゲノムDNA配列と比較し、イントロンおよびフレームシフトエラーを得ることができる。

【0340】

表7 - cDNAに基づく配列延長に用いたデータベース

【表13】

データベース	データベース日付
LifeGold templates	2000年10月
LifeGold compseqs	2000年10月
LifeGold compseqs	2000年10月
LifeGold compseqs	2000年10月
LifeGold fl	2000年10月
LifeGold flft	2000年10月
NCBI ヒト Ests	2000年10月
NCBI ネズミ Ests	2000年10月
NCBI 非重複	2000年10月

【0341】

表8 - ゲノムに基づく配列延長に用いたデータベース

【表14】

データベース	登録物の数	データベース日付
Celera v. 1-5	5,306,158	01/19/00
Celera v. 6-10	4,209,980	03/24/00
Celera v. 11-14	7,22,425	04/24/00
Celera v. 15	243,044	05/14/00
Celera v. 16-17	25,885	04/04/00
Celera Assembly 5 (R1. 25)	3,313	10/13/00
Celera Assembly 4 (R1. 24)	636,234	08/28/00
Celera Assembly 3 (R1. 22, 1. 23)	1,132,900	07/21/00
HGP Phase 0	4,944	05/04/00
HGP Phase 1	28,478	05/05/00
HGP Phase 2	1,508	05/04/00
HGP Phase 3	9,971	05/05/00
HGP Phase 0	3,189	11/1/00
HGP Phase 1	20,447	11/1/00
HGP Phase 2	1,619	11/1/00
HGP Phase 3	9,224	11/1/00
HGP Chromosomal assemblies	2759	08/1/00

【0342】

結果

仮出願において遺伝子を延長するのに用いた配列情報源を以下に示す。Genewiseを用いて延長した遺伝子については、蛋白質オルトログおよびゲノム

DNAの受託番号が記載されている(Genewiseはゲノム配列から標的遺伝子のコーディング配列を組み立てるためにオルトログを用いる)。オルトログのアミノ酸配列は、蛋白質のNCBI非重複データベースから得た(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html>)。ゲノムDNAは2つの起源、すなわち、CeleraおよびNCBI-NRNAからのものであり、これは以下に示される。cDNA起源もまた以下に示される。略号：HGP：ヒトゲノムプロジェクト；NCBI，National Center for Biotechnology Information。

【0343】

SGP006 (配列番号1)

N末端領域(1-335)は、Celeraコンティグ300825903を用いるGenewise予測、および蛋白質ホモログgi|7242951、gi|8923483およびgi|6714641から導かれた。Celeraコンティグ300825903のGenscan予測も用いた。配列を延長するために用いたNCBI ESTは以下のとおりである：BE793092.1、gi|9127446、gi|5927364、gi|8148569、gi|9096610、gi|0214290、gi|5927365、gi|4533101、gi|1948748、gi|2010582、gi|30571、gi|2433225、gi|8152915。Incyte配列339266.1はエクソン7(GFSVSTAGRMHIFKPVSVQAMW)を欠失している。公共の配列gi|7242951(KIAA1298)はエクソン11を欠失しており、エクソン10の最初の近くから始まる。エクソン11の欠失によりフレームシフトが生じ、したがって、KIAA1298は別のN末端予測ペプチドを有し、エクソン10は異なるフレームである。SGP006は、SGP006のC末端の715アミノ酸(アミノ酸335-1049)にわたり、KIAA1298と同一である。

【0344】

SGP006 (配列番号1)は6374ヌクレオチドの長さである。オープン

リーディングフレームは位置34で開始し、位置3183で終了し、3150ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は1049アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー):二重ホスファターゼ, DSP, MKP。この遺伝子は染色体位置12q21.3-q22にマップされる。この染色体位置の増幅は以下のヒト疾病と関連づけられている:膀胱癌腫(12q21-q24, 1/16)(Knuutila, et al.)。この遺伝子は次の位置に一塩基多型候補を含む:6222=R(ccaaacataagtg g c a c a r) dbSNP | rs881179__allele。この遺伝子の公共ドメイン(dbEST)におけるESTは以下のとおりである:BE793092.1, AI651213.1, BE256978.1。この遺伝子は以下のヌクレオチド位置において反復配列を有する:Alu5750-6010;5750-5770。

【0345】

SGP002(配列番号2)

SGP002核酸配列は、CeleragenomDNA70000016592596を用いるGenewiseアルゴリズムの実行および蛋白質ホモログgi_6679156から導かれた。同様のGenscan予測により、N末端延長が得られ、HGPコンティグgi|7658297との比較により予測中のフレームシフトを補正した。近いホモログは同じ長さである。NCBI EST gi|7950699およびgi|760983はそれぞれ5'および3'UTR中に延長される。ゲノム配列を用いてこれらのESTの配列エラーを補正した。NCBI EST gi|0717958はスプライシング変種をコードする。Incycyte EST1026659.2はホスファターゼドメインの一部を含むエクソンを欠失している選択的スプライシング型をコードする。Incycyte EST1026659.7は、追加の172ヌクレオチドの5'UTRを遺伝子に付加する。Incycyteおよび公共のESTは、多くの組織、最も一般的には、消化系、神経系、呼吸系、および雄および雌生殖器における発現を示す。

【0346】

SGP002 (配列番号2) は2732ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置538で開始し、位置2535で終了し、1998ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は665アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー): 二重ホスファターゼ, DSP, MKP。この遺伝子は染色体位置12p11.1-p12.1にマップされる。この染色体位置は、以下のヒト疾病と関連づけられている: 精巣癌(12p11.2-p12.1, 10/11); 非小細胞肺癌(12p11.2-p12, 4/50), および乳癌腫(12p11-pter, 2/36)(Knuutila, et al.)。この遺伝子の公共ドメイン(dbEST)におけるESTは以下のとおりである: BE897795。この遺伝子は以下のヌクレオチド位置において反復配列を有する: 2610-2631。

【0347】

SGP001 (配列番号3)

genscanおよびCeleraconティグ5000012164505, および蛋白質ホモログgi_6714641およびgi_7242951を用いるgenewiseを用いる。いくつかの公共およびIncyte ESTを用いて遺伝子を延長し、ゲノムデータを用いてEST配列エラーを補正した。これらには以下のものが含まれる: Incyte配列: 210343.1, 210343.2, 637331CB1; およびNCBI ESTs: gi|3894502, gi|00172, gi|11100172, gi|4137370, gi|6505071, gi|6885171, gi|1123262, およびgi|6590412。

【0348】

SGP001 (配列番号3) は2260ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置709で開始し、位置2205で終了し、1497ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は498アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー): 二重ホス

ファターゼ, DSP, MKP。この遺伝子は染色体位置Xp11.1-11.3にマップされる。この染色体位置は以下のヒト疾病と関連づけられている: 前立腺癌(Xp11-q13, 1/9)および小細胞肺癌(Xp11.2, 1/13)(Knuutila, et al.)。この遺伝子の公共ドメイン(dbEST)におけるESTは以下のとおりである: AI272231, BF206586。この遺伝子は以下のヌクレオチド位置において反復配列を有する: 579-598。

【0349】

SGP018 (配列番号4)

SGP018の配列は, Celeraconテグ68000017706859から, gi_7305011およびgi_7705959とのGenscanおよびgenewiseを用いて予測される。genewise予測は推定ホスファターゼのほとんどをカバーする。Genscan予測はgenewise予測と重複してこれを延長し, genscanのほとんど全ては, IncyteおよびdbESTからのESTによりカバーされた。すべての場合において, ESTは最初にゲノム(Celera/HGP)配列と整列させることにより補正した。Genscanにより予測されるスプライシング変種は, 配列SEFLDEALLTYRをYCHYIIFSCVFISで置き換える(ヌクレオチド配列はACTGTCATTACATCATTTTCTCTTGTGTTTTTCATTTTCからCTGAGTTCCTGGATGAGGCGCTGCTGACTTACAGに変化)。EST起源: Incyte配列: 981712.1, 981712.3, 981712.2, 364575.1, 061688.1, 144608.1, 7668648H1, 7473603CB1, 7473604CB1。公共ESTは以下のものを含む: gi|6880197, gi|6880191, gi|6880141, gi|5441204, gi|5441149, gi|1242174, gi|10984357。Genscanはまた, VHLLからC末端までの配列が以下の配列に置き換えられている選択的C末端を予測する:

ANGNSVRSTSRFSSSSTREGREMHKFSRSTYNETSS

S R E E S P E P Y F F R R T P E S S E R E E S P E P Q R P W A R S R D W
 E D V E E S S K S D F S E F G A K R K F T Q S F M R S E E E G E K E R T
 E N R E E G R F A S G R R S Q Y R R S N D R E E E E M D D E A I I A A W
 R R R Q E E T R T K L Q K R R E D

【0350】

544 - 612からのcDNA配列はいずれのESTにもカバーされていない。したがって、上流および下流の配列は異なる遺伝子であるかもしれず、位置613における開始は、後のM L E S A Eで開始するペプチドを与える。これは、最も近いマウスホモログ、PTP13と良いホモロジーおよび同じN末端長さを有する蛋白質を与える。i n c y t e E S T 0 6 1 6 8 8 . 1および7668648H1の比較により見いだされる潜在的な選択的スプライシング形は、N末端を欠失し、その代わりに配列M T P E Kで開始する蛋白質の形を予測する。

【0351】

S G P 0 1 8 (配列番号4)は4361ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置208で開始し、位置3609で終了し、3402ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は1133アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー):二重ホスファターゼ, DSP, MKP。この遺伝子の染色体位置はマップされていない。この遺伝子は次の位置に一塩基多型候補を含む: 2929 = M (a g a a g a t g t c t g a g t a c m) d b S N P | s s 1 7 6 5 9 4 1 ; 1 1 6 1 = S (c a t c t a c c c c a a t g a s) d b S N P | s s 1 7 6 5 9 4 0。この遺伝子の公共ドメイン(d b E S T)におけるESTは以下のとおりである: B F 1 1 4 8 8 1。この遺伝子は以下のヌクレオチド位置において反復配列を有する: 1603 - 1627。

【0352】

S G P 0 0 3 (配列番号5)

S G P 0 0 3配列は、C e l e r aコンティグ173000019613519およびNCBIホモログテンプレートg i _ 7 7 0 5 9 5 9を用いるGene

w i s eから誘導し，ゲノムウォーキングにより終止コドンまで延長した。c D N Aテンプレートは，4つのE S Tクローン，筋肉から2つ，骨および副甲状腺から各1つを用いて構築した。H G Pコンティグg i | 1 0 1 7 8 2 6 6を用いて配列中のフレームシフトを補正し，ゲノムを最初の終止コドンまで5'ウォーキングすることにより配列をさらに延長した。S G P 0 0 3は，開始コドンの前にヌクレオチド3からヌクレオチド239まで延びる235ヌクレオチドオープンリーディングフレームを有し，これは以下に大文字で示される：

```
c a A G G G T T T C A G G T C G C A C T G G A A A A T C A T T T T G C A
A G C A G A T G T C A T A G G T C T C C T C T T A G A C T G G A C G G C
A C G C A A G G T C A G C G T C A C A G A T C T G A C C C T A A A A T
A G G C C T C T G T T G C C A G T C G G G G T G G C T G G G C G T G C G
G C T G C T A C A T G C C C C A C G G A C C A G A A C C T C C C G A C G
C G G C C A G G C C C C G G C A C A C C C A G C T G C A G A A A G G A G
A G A A A A T C C C T T G G C T C T A A A a t g
```

このオープンリーディングフレームは以下のペプチド配列をコードする：

```
Q G F Q V A L E N H F A S R C H R S P L R L D G T Q G Q R H R S D P K N
R P L L P V G V A G R A A A T C P T D Q N L P T R P G P G T P S C R K E
R K S L G S K
```

位置240の開始コドンは，開始メチオニンに関するコザック規則に合致しており，-3位にAを有する。

【0353】

S G P 0 0 3（配列番号5）は1262ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置240で開始し，位置902で終了し，663ヌクレオチドの長さのO R Fを与える。予測蛋白質は220アミノ酸の長さである。この配列は全長である（開始メチオニンから終止コドンまで）。これは以下のように分類される（スーパーファミリー/グループ/ファミリー）：二重ホスファターゼ，D S P，M E T。この遺伝子は染色体位置C H R 1 0にマップされる。この遺伝子は以下のヌクレオチド位置において反復配列を有する：311 - 334。

【0354】

SGP014 (配列番号6)

SGP014の配列は、Celeraconティグ92000005033031から、蛋白質ホモログテンプレートgi__7293532, gi__7705959およびgi__9502074を用いるgenscanおよびgenewiseを用いて構築した。予測されたgenewise/genscan蛋白質をdbESTからのいくつかのEST(AA723271, AW444890.1, AA435513.1)との重複により延長し、公共の配列gi|7705959で確認した。全長推定ペプチドは549アミノ酸であり、全長DSPドメインは37-181および368-541である。以下のNCBI ESTはこの遺伝子に由来する: gi|11105857, gi|1998334, gi|1423340, gi|2186481, gi|6986652, gi|10372533, gi|2186305, gi|4825880, gi|2740908, gi|3213953, gi|2436350, gi|2140427, gi|2833919, gi|5768154, gi|1134009, gi|2046580, gi|4822411, gi|11152927。以下のIncyte配列はこの遺伝子に由来する: 128077.1, 1384255.1, 8009838H1, 304421CB1。選択的スプライシングは非常に一般的である。個々のエクソンは以下のとおりである: エクソンの末端の挿入アミノ酸は、少なくとも全長形においてはエクソンを横断する残基である。

【0355】

エクソン1: MAETSLPELGGEDKATPCPSILELEELLR
AGKSSCSRVDVWPNFLFIGD(A)

エクソン2: ATANNRFELWKLGITHTVLNAAHKGLYCQGG
PDFYGSSVSYLGVPAHDLPDFDISAYFSSAADFIHR
ALNTPG(A)

エクソン3: KVLVHCWGVSRSATLVLAYLMLHQRLSLRQ
AVITVRQHRWVFPNRGFLHQLCRLD(H)

エクソン4: WSLLPAMGLCHFATLALILLVLLLEALAQAD

TQKMVEAQRGVGPRACYSIWLLLAPTPPLSHCLQSP

Q

エクソン5 : KQHQCVCGRRLKASSTNCPSEKCTAWARYS
HRW

エクソン6 : AHILVPLKIQLR RVPDSFSQQMPETSYLTR
VGPDIQCWPESW(G)

エクソン7 : MDSLQKQDLRRPKIHGAVQASPYQPPTLAS
LQRL LWVRQAATLNHIDEVWPSLFLGD(A)

エクソン8 : YAARDKSKLIQLGITHVVNAAGKFQVDTG
AKFYRGMSLEYGIEADDNPF FDL SVYFLPVARYIR
AALSVPQ(E)

エクソン9 : DGHGCLFFPKGWVVQGVADAKLVLPTGRV
LVHCAMGVSRSATLVLAFLMICENMTLVEAIQTVQA
HRNICPNSGFLRQLQVLDNRLGRETRF

【0356】

DSPドメイン1はエクソン1の後半分からエクソン3に達し、ドメイン2はエクソン7の末端近くからエクソン9のほぼ末端に達する。ESTにより示される選択的スプライシング：エクソン9の開始点(EDG-LPT)は、gi|6986652, gi|2186305において欠失しており、gi|10372533はエクソン8の末端およびエクソン9の開始点(KFQ-LPT), を欠失しており、gi|11105857はエクソン2, 3, 4, 6, およびエクソン9の開始点(EDG-GRV)を欠失している。これはエクソン1と5の間にフレームシフトを有し、これはシークエンスエラーであろう。gi|2186481はエクソン2, 3, 6を欠失している。gi|2740908, gi|2436350, gi|2140427, gi|2833919は、エクソン9の末端近くのコンセンサスに対してフレームシフトを有し、これはNSGFの後の配列をSGSSRFWTTDWGGRRGGSDLAGSQDPで置き換える。この変化により、ホスファターゼドメインの末端が破壊され、これはデータベース中のいずれとも類似していない。これは個体間のゲノム多型または反復配列エラ

ーのためであろう。あるいは、ある形の遺伝子制御のためであるかもしれない。これらのESTは、精巢(2, 同じライブラリ), 前立腺および心臓に由来しており、したがって、ライブラリのアルチファクトではない。8009838H1はYLG-SSAからのエクソン2中に内部欠失を有する。304421CB1は、エクソン2-6を欠失しており、エクソン1と7の間にフレームシフトを有し、エクソン9の開始点を欠失している。128077.1はエクソン2, 3, 6およびエクソン9の開始点を欠失している。

【0357】

SGP014 (配列番号6) は1917ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置31で開始し、位置1680で終了し、1650ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は549アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー): 二重ホスファターゼ, DSP, MKP。この遺伝子は染色体位置10q21.3にマップされる。この染色体位置は以下のヒト疾病と関連づけられている: 頭頸部扁平上皮癌(10q21-q22, 2/30) (Knuutila, et al.)。この遺伝子の公共ドメイン(dbEST)におけるESTは以下のとおりである: AA723271, AW444890.1, AA435513.1。

【0358】

SGP060 (配列番号7)

SGP060の配列は、Celeraコンティグ6514035__1および蛋白質ホモログNP__057448を用いるGenewiseから導かれる。配列を延長するために用いたNCBI ESTには、BF207232, BF314818, AW953216.1が含まれる。

【0359】

SGP060 (配列番号7) は636ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し、位置636で終了し、636ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は211アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分

類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー):二重ホスファターゼ, DSP, MKP。この遺伝子は染色体位置8p11.1-q11.1セントロメアにマップされる。この染色体位置は,以下の疾病と関連づけられている:乳癌腫(8p11-p12, 8/53);非小細胞肺癌(18p11.2, 2/50)(Knuutila, et al.)。この遺伝子の公共ドメイン(dbEST)におけるESTは以下のとおりである:BF207232, BF314818, AW953216.1。

【0360】

SGP008 (配列番号8)

Celeraコンティグ78000006091415について,ホモログgi|9910432, gi|7294466およびgi|7298988を用いてGenscanおよびgenewiseを行った。公共ESTgi|7280554, gi|6925677およびgi|6142140, およびIncyte配列7475576CB1を用いてこれらを確認し,延長した。予測cDNAは, Celeraコンティグおよび現在のHGPコンティグからの配列を用いて補正した。非ヒトESTおよび公共の蛋白質配列との比較から,アミノ酸位置95(MGNG)において蛋白質の内部の開始が存在することが示される。

【0361】

SGP008 (配列番号8)は1326ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し,位置990で終了し,990ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は329アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー):二重ホスファターゼ, DSP, STYX。この遺伝子は染色体位置20q11.2にマップされる。この遺伝子は次の位置に一塩基多型候補を含む:871=S(cagcagccctccgagggaaccs)dbSNP|ss1389419。この遺伝子の公共ドメイン(dbEST)におけるESTは以下のとおりである:AW406620.1, BF377364.1, AW593296.1。この遺伝子は以下のヌクレオチド位置において反復配列を有する:1251-1270。

【0362】

SGP039 (配列番号9)

SGP039は、C e l e r a配列17000030279756, およびI n c y t e配列272616.1および7476908CB1kら導かれる。

【0363】

SGP039 (配列番号9) は1083ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し, 位置1083で終了し, 1083ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は360アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー): セリンホスファターゼ, STP, PP2C。この遺伝子の染色体位置はマップされていない。この遺伝子の公共ドメイン(d b E S T)におけるESTは以下のとおりである: BE147139。

【0364】

SGP040 (配列番号10)

SGP040の配列は, C e l e r a配列17000091609039およびピルビン酸デヒドロゲナーゼホスファターゼの公共の配列NM018444.1から導かれる。

【0365】

SGP040, PDP (配列番号10) は1725ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し, 位置1725で終了し, 1725ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は574アミノ酸の長さである。この配列は全長である(開始メチオニンから終止コドンまで)。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー): セリンホスファターゼ, STP, PP2C。この遺伝子は染色体位置8q21.3にマップされる。この染色体位置は以下のヒト疾病と関連づけられている: 被膜細胞リンパ腫(18q21-q23; 5/50) (Knuutila, et al.)。この遺伝子の公共ドメイン(d b E S T)におけるESTは以下のとおりである: AV706533.1, AV705571.1, AV710801.

1。

【0366】

SGP012 (配列番号11)

SGP012の配列は、ゲノムDNA入力としてCeler a配列94000002120453;142000016367225;142000016006753を用い、蛋白質ホモログとしてNP_031981(ネズミPTP-EST)を用いるGenewiseから導かれる。この配列と重複するIncycyte ESTSには、1005303.1および7109651__3が含まれる。この配列と重複する公共ESTには、AL042532.1, AI381571, およびAW872677が含まれる。

【0367】

SGP012PTP-ESP(配列番号11)は4719ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し、位置4719で終了し、4719ヌクレオチドの長さのORFを与える。この遺伝子のゲノム配列はかなり質が低い。すなわち、まだ組み立てられておらず、明らかな配列の誤りを有する。したがって、核酸および蛋白質配列は部分的であり、配列中に"X"で示されるギャップを有する。予測蛋白質は1573アミノ酸の長さである。この配列は触媒ドメインを含む。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー):チロシンホスファターゼ, RPTP, PTPd。この遺伝子の染色体位置はマップされていない。この遺伝子の公共ドメイン(dbEST)におけるESTは以下のとおりである:AL042532.1, AI381571, AW872677。この遺伝子は以下のヌクレオチド位置において反復配列を有する:1305-1324。

【0368】

SGP024 (配列番号12)

SGP024は、は、ゲノム起源としてCeler aDNA配列142000016226692, 蛋白質ホモログとしてNP_002830.1(ヒトPTPデルタ)を用いるGenewiseから導かれる。

【0369】

SGP024 (配列番号12) は354ヌクレオチドの長さである。オープンリーディングフレームは位置1で開始し、位置357で終了し、357ヌクレオチドの長さのORFを与える。予測蛋白質は118アミノ酸の長さである。この配列は部分的触媒ドメインである。これは以下のように分類される(スーパーファミリー/グループ/ファミリー): チロシンホスファターゼ, レセプターPTP, PTPデルタサブファミリー。

【0370】

実施例2: 予測蛋白質

SGP006, KIAA1298 (配列番号1) は配列番号13の1049アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはMKPとして分類される。この蛋白質中のホスファターゼドメインはMKP/DSPホスファターゼの隠れマルコフプロファイルとプロファイル位置1からプロファイル位置173でマッチする(全長触媒ドメイン)。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸308からアミノ酸446である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである。SGP006のC末端(アミノ酸位置322-1049)はKIAA1298蛋白質[*Homo sapiens*]と100%同一である。出力の概要は以下のとおりである: P値=0; 同一のアミノ酸の数=715; パーセント同一性=100%; パーセント類似性=100%; NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はBAA92536.1である; NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである: KIAA1298蛋白質[*Homo sapiens*]。KIAA1298とのこの蛋白質のN末端側の領域は新規である。アミノ酸120-477について、アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである: P値=1.50E-99; 同一のアミノ酸の数=248; パーセント同一性=46%; パーセント類似性=59%; NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はBAA89534.1である; NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである: MAPキナーゼホスファターゼ[*Drosophila melanogaster*]。SGP006のN末端配列のアミ

ノ酸1-263もまた新規であり、アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = 6.80×10^{-58} ；同一のアミノ酸の数 = 119；パーセント同一性 = 41%；パーセント類似性 = 59%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP-060327.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：仮定蛋白質FLJ20515 [Homo sapiens]。

【0371】

SGP002 (配列番号2)は、配列番号14の665アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはMKPとして分類される。この蛋白質中のホスファターゼドメインは、MKP/DSPホスファターゼドメインの隠れマルコフとプロファイル位置1からプロファイル位置173でマッチする(全長触媒ドメイン)。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸158からアミノ酸297である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = 1.10×10^{-157} ；同一のアミノ酸の数 = 304；パーセント同一性 = 46%；パーセント類似性 = 60%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP__004411.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：二重特異性ホスファターゼ8 [Homo sapiens]。この蛋白質はローダネース様ドメインを含む(アミノ酸11-131)。ローダネースドメインはチオ硫酸：シアニドサルファトランスフェラーゼ(EC2.8.1.1)活性と関連づけられている。このドメインの存在は、SGP002が細胞の酸化還元環境に応答して制御されていることを示すかもしれない(Nandi et al., Int J Biochem Cell Biol 2000 Apr; 32(4): 465-73; Rhodanese as a thioredoxin oxidase)。

【0372】

SGP001 (配列番号3)は、配列番号15の498アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはMKPとして分類される。この蛋白質中のホスファター

ゼドメインはMKP/DSPホスファターゼドメインの隠れマルコフプロファイルとプロファイル位置1からプロファイル位置173でマッチする。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸307からアミノ酸441である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：Pスコア = $8.30E-133$ ；同一のアミノ酸の数 = 250；パーセント同一性 = 47%；パーセント類似性 = 60%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はBAA89534.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：MKP [*Drosophila melanogaster*]。

【0373】

SGP018 (配列番号4)は、配列番号16の1133アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはMKPとして分類される。この蛋白質中のホスファターゼドメインはMKP/DSPホスファターゼドメインの隠れマルコフプロファイルとプロファイル位置1からプロファイル位置173でマッチする。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸185からアミノ酸330である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = $2.20E-27$ ；同一のアミノ酸の数 = 79；パーセント同一性 = 45%；パーセント類似性 = 63%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号は05744.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：蛋白質ホスファターゼLOC51207 [*Homo sapiens*]。

【0374】

SGP003 (配列番号5)は、配列番号17の220アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはMKPと分類される。この蛋白質中のホスファターゼドメインはMKP/DSPホスファターゼドメインの隠れマルコフプロファイルとプロファイル位置1からプロファイル位置173でマッチする。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸54からアミノ酸199である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = $3.40E-54$ ；同一のアミ

ノ酸の数 = 91 ; パーセント同一性 = 49% ; パーセント類似性 = 68% ; NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP__057448.1である ; NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである : 蛋白質ホスファターゼLOC51207 [Homo sapiens]。

【0375】

SGP014 (配列番号6) は, 配列番号18の549アミノ酸の長さの, 2つのホスファターゼドメインを有する蛋白質をコードする。この蛋白質中のいずれのドメインもMKP/DSPホスファターゼプロファイルの隠れマルコフプロファイルと位置1からプロファイル位置173でマッチする (全長)。両方のDSPドメインは類似しており, gi|7705959 (ヒト ; この遺伝子の一部) , およびマウスからのDSP13と最もよくヒットする。コードされる蛋白質の触媒領域の位置は, N末端ドメインについてはアミノ酸37からアミノ酸181であり, C末端ドメインについては368から520である。

【0376】

アミノ酸配列 (NRAA) の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである : アミノ酸324 - 549について, P値 = $7.50E-122$; 同一のアミノ酸の数 = 198 ; パーセント同一性 = 88% ; パーセント類似性 = 88% ; NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP__057448.1である ; NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである : 蛋白質ホスファターゼLOC51207 [Homo sapiens]。アミノ酸1 - 198については, アミノ酸配列の公共データベースをスミス・ウォーターマン検索した結果は以下のとおりである : P値 = $8.20E-36$; 同一のアミノ酸の数 = 75 ; パーセント同一性 = 45% ; パーセント類似性 = 65% ; NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP__004081.1である ; NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである : 二重特異性ホスファターゼ3 [Homo sapiens]。

【0377】

SGP060 (配列番号7) は, 配列番号19の211アミノ酸の長さの蛋白

質をコードする。これはMKPと分類される。この蛋白質中のホスファターゼドメインは、MKP/DSPホスファターゼの隠れマルコフプロファイルとプロファイル位置1からプロファイル位置173でマッチする(全長)。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸61からアミノ酸204である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = 1.10×10^{-48} ；同一のアミノ酸の数 = 86；パーセント同一性 = 53%；パーセント類似性 = 72%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP_057448.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：蛋白質ホスファターゼLOC51207 [Homo sapiens]。

【0378】

SGP008(配列番号8)は、配列番号20の329アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはMKP / STYXと分類される。この蛋白質中のホスファターゼドメインはMKP/DSPホスファターゼドメインの隠れマルコフプロファイルとプロファイル位置1からプロファイル位置173でマッチする。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸98からアミノ酸235である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = 4.40×10^{-172} ；同一のアミノ酸の数 = 260；パーセント同一性 = 92%；パーセント類似性 = 92%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はCAC10008.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：新規蛋白質 [Homo sapiens]。

【0379】

SGP039(配列番号9)は、配列番号21の360アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはPP2Cと分類される。この蛋白質のホスファターゼドメインは隠れマルコフプロファイルとプロファイル位置1からプロファイル位置301までマッチする(全長触媒)。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸91からアミノ酸344である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下の

とおりである：P値 = $1.00E-106$ ；同一のアミノ酸の数 = 164；パーセント同一性 = 98%；パーセント類似性 = 99%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はAAD17235.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：PP2C [Mus musculus]。

【0380】

SGP040, PDP (配列番号10)は、配列番号22の574アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはPP2Cと分類される。この蛋白質中のホスファターゼドメインは隠れマルコフプロファイルと位置1から位置301でマッチする。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸209からアミノ酸497である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = 0；同一のアミノ酸の数 = 574；パーセント同一性 = 100%；パーセント類似性 = 100%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP__060914.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：ピルビン酸デヒドロゲナーゼホスファターゼ [Homo sapiens]。

【0381】

SGP012PTP-ESP (配列番号11)は、配列番号23の1573アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これは以下のように分類される：PTP, デルタホスファターゼ様。この蛋白質中のホスファターゼドメインは、隠れマルコフプロファイルとPTPホスファターゼのプロファイル位置1からプロファイル位置264でマッチする(全長触媒)。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸1010から1259である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = 0；同一のアミノ酸の数 = 1053；パーセント同一性 = 60%；パーセント類似性 = 70%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はNP__031981.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：胚性幹細胞ホスファターゼ [Mus

musculus]。この蛋白質は5個のフィブロネクチンドメインを含む：
アミノ酸位置35 - 120；128 - 208；390 - 471；484 - 558
；668 - 748。配列のギャップは"XXX"により表される。

【0382】

SGP024 (配列番号12) は配列番号24の118アミノ酸の長さの蛋白質をコードする。これはPTPと分類され、PTPデルタと関連する。この蛋白質中のホスファターゼドメインは、隠れマルコフプロファイルとPTPのプロファイル位置205からプロファイル位置264でマッチする(これはC末端領域を表す部分触媒ドメインである)。コードされる蛋白質中の触媒領域の位置はアミノ酸3からアミノ酸58である。アミノ酸配列(NRAA)の公共データベースをこの蛋白質配列でスミス・ウォーターマン検索を行った結果は以下のとおりである：P値 = 5.90×10^{-54} ；同一のアミノ酸の数 = 90；パーセント同一性 = 76%；パーセント類似性 = 82%；NRAA中の最も類似する登録物の受託番号はCAA38068.1である；NRAA中の最も類似する蛋白質の名前または説明および種は以下のとおりである：蛋白質チロシンホスファターゼデルタ[Homo sapiens]。

【0383】

実施例3. 新規哺乳動物蛋白質ホスファターゼの発現分析

選択された遺伝子についての遺伝子発現パターンを、以下の2つの手法を用いて研究した：1) Suganで開発した組織マイクロアレイ、499の組織を含み、標識遺伝子で探索する；および2) Clontechからの市販の組織アレイ、標識遺伝子で探索する。

【0384】

1) 組織アレイ

種々の起源に由来する"cDNAライブラリ"をナイロン膜上に固定化し、目的とする遺伝子に由来する ^{32}P 標識cDNAフラグメントで探索した。RNAの起源は表3に示される：1) Biochain Institute (Hayward, CA; <http://www.biochain.com/main3.html>)；2) Clontech (Palo Alto, CA, <http://>

/www.clontech.com/): 3) the National Cancer Institute (NCI) Developmental Therapeutics Program (<http://dtp.nci.nih.gov/>: ATCC: <http://www.atcc.org/catalogs.html> から注文可能) により用いられた哺乳動物細胞株; 4) Path Associates (<http://www.saic.com/company/subsidiaries/pai.html>: San Diego, California)。cDNAアレイを調製するプロトコルは以下に詳細に記載される。いくつかの細胞株を化合物で処理して、それが遺伝子発現におよぼす影響を評価した。8種類の処理を用いた: 1) 対照, 2) 低血清, 3) 200 μ M ミモシン, 4) 3 mM HU, 5) 2 μ M AUR2 阻害剤, 6) 10 μ M シスプラチン, 7) 400 ng/ml ノコダゾール - 24時間, および 8) 400 ng/ml ノコダゾール - 48時間。処理した細胞株は細胞株名およびその次の1-8の番号で示される。

【0385】

450以上の組織または細胞株起源に由来する"cDNAライブラリ"をナイロン膜に固定化し、目的とする遺伝子に由来する 32 P-標識cDNAフラグメントで探索した。cDNAを作成するためには、総RNAまたはmRNAを逆転写反応においてテンプレートとして用いて、両端に特定の配列でタグ付けされた一本鎖cDNA(sscDNA)を生成した。特定の配列(CDS: AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT₃₀VN(V=A,G,CN=A,G,C,T))を含むオリゴdTプライマーは、mRNAの3'末端のポリAトラックにアニーリングし、リバーストランスクリプターゼ(MMLV Rnase H⁻)はRNA鎖の末端に到達するまでアンチセンス鎖を転写し、ここで追加のC残基を付加する。3つのGで終わるプライマー(SMII: AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGまたはML2G: AAGTGGCAACAGAGATAACGCGTACGCGGG)を加えると、これは付加されたCにアニーリングし、MMLVはプライマー配列の残りをテンプレートとして認識して転写を続ける。その結果、合成されたcDNAは5'末端および3'

'末端の両方に特定の配列タグを含む。5'末端および3'末端を同じ配列(CDSおよびSMII)でタグ付けした場合、これは"対称"と称される。5'末端を3'末端とは異なる配列(CDSおよびML2G)でタグ付けした場合、これは"非対称"と称される。次に、付加された配列タグにアニーリングする3'PCRおよびML2プライマー(3'PCR:AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTおよびML2:AAGTGGCAACAGAGATAACGCGT)を用いて、PCR増幅により二本鎖"cDNAライブラリ"を生成する。

【0386】

増幅させた"cDNAライブラリ"を384ピンレプリケータを用いて手でナイロン膜上に配列させた。DNAをアルカリ処理により変性させ、中和し、UV光で架橋させた。アレイをExpress Hyb(Clontech)でプレハイブリダイズさせ、目的とする遺伝子に対応するcDNAフラグメントのランダムヘキサマープライミングにより生成した³²P標識プローブを用いてハイブリダイズさせた。洗浄した後、プロットをホスファージングカセットに露光し、シグナルの強度を定量した。アレイ上のDNAの量もまた、非変性または変性アレイをそれぞれSyber Green IまたはSyber Green IIで2分間処理することにより定量した(1:100,000,50mM Tris,pH8.0中)。50mM Tris,pH8.0で洗浄した後、ホスファージャー(Molecular Dynamics)で蛍光放出を検出し定量した。整列させたDNAの量を用いてハイブリダイゼーションシグナルを標準化し、補正值を表5に示す。

【0387】

統計学的方法:

3種類のホスファターゼについてのこの組織アレイのデータを、異なる組織タイプにわたって、レンジ規格化を用いて統計学的分析用に規格化した。規格化は、測定値を一般的スケールに変換する。我々は各変数の最も小さい値を各値から引いてそのレンジで割るレンジ標準化を用いた。新たなスケールは0で始まり、1.0で終わる。標準化したデータについて以下の統計学的方法を実行した:記述的統計の生成、グラフによる可視化、階層的およびk平均クラスター分析(1

0, 7, および5クラスター), および分散分析(ANOVA)を用いる群間の比較。特定の組織タイプについて正常および腫瘍組織の両方のデータが存在する場合, 2つの群を差異について直接比較した。すべての統計学的分析は, 対称および非対称組織アレイ実験室方法について別々に行った。これは, 過去のデータを用いた経験から, 遺伝子発現は用いた方法に依存することがわかっているためである。すべての統計学的分析はSYSTAT9.01(著作権1999, SPSS, Inc.)を用いて行った。

【0388】

結果の概要

表9 - 正常ヒト組織と癌細胞株, および正常組織と腫瘍試料との間の平均発現の相違

【表15】

CDNA	遺伝子	組織 vs. 細胞株	正常 vs. 腫瘍		
			プール	細胞株間	組織間
対称	SGP003	23.02	28	6.26	10.92
対称	SGP060	2.86	2.67	-1.92	0
対称	SGP018	2.25	2.33	2.4	-1.32
非対称	SGP003	+2.33**	1.37	1.19	-1.03
非対称	SGP060	+2.38****	1.08	-2.06	-1.26
非対称	SGP018	1.01	1.51***	-1.43*	-1.72**

- ・ (ANOVA F, $p \leq 0.1$), ** (ANOVA F, $p \leq 0.05$),
- ・ *** (ANOVA F, $p \leq 0.01$), **** (ANOVA F, $p \leq 0.001$)

対照: [n = 41 (組織), 66 (細胞株), 4 (正常細胞株), 62 (腫瘍細胞株), 40 (正常組織), および1 (腫瘍組織)]

非対称: [n = 112 (組織), 262 (細胞株), 43 (正常細胞株), 219 (腫瘍細胞株), 49 (正常組織), および63 (腫瘍組織)]

【0389】

考察

1. SGP003 (配列番号5)

この遺伝子は, 対称および非対称方法のいずれにおいても, 組織試料(細胞株

試料と比較して) および正常試料(腫瘍試料と比較して)において一貫してより高く発現されていることが観察された。対称方法において非対称方法におけるよりさらに大きい相違が認められた(表9)。しかし, 不適切な試料サイズおよびデータの大きな変動のため, 対称方法においては, この相違は統計学的に有意であるとは考えられなかった。一方, 非対称方法における組織と細胞株試料との間の2.33倍の相違は, $p < 0.05$ で統計学的に有意であった。このホスファターゼは腫瘍試料において正常試料よりも高く発現されるため, これは腫瘍抑制に役割を果たすかもしれない。この遺伝子の最も高いレベルの発現は, 正常試料, 特に脳, 胎児脳, 胎児腎臓, および腺からの組織, 例えば下垂体および副腎から得られた試料において観察される。いくつかの腫瘍試料(リンパ芽球腫, 神経芽細胞腫, 黒色腫, 肺, 結腸, 乳, および腎臓腫瘍)において比較的高いレベルの発現が認められた。選択されたクラスターおよびこのホスファターゼの発現レベルにしたがうそのランキングは以下に示される:

【0390】

(対照データ)

最高平均発現によるクラスターランキング:

- ・クラスター1(単集合)。正常群: 心臓試料(組織)。
- ・クラスター2(単集合)。正常群: 脊髄(組織)。
- ・クラスター3(8メンバー)。正常群のみ: 結腸(胃組織), 結腸(小腸組織), 乳上皮細胞(細胞株), 脾臓(ヘム組織), リンパ節(ヘム組織), 胎児肺(組織), 胎児脳(神経組織), および前立腺(組織)。

【0391】

(非対称データ)

最高平均発現によるクラスターランキング:

- ・クラスター1(単集合)。正常群: 副腎(組織)。
- ・クラスター2(3メンバー)。正常群: 胸腺(ヘム組織)。腫瘍群: 肺癌腫(細胞株), および神経試料(組織)。
- ・クラスター3(14メンバー)。正常群: 甲状腺(組織), リンパ節(ヘム組織), および心臓動脈内皮細胞(細胞株); および腫瘍群: 肺(組織), 悪性黒

色腫，肺に転移（細胞株），乳（細胞株），未知（細胞株），乳（細胞株），HNS（組織），内皮（細胞株），内皮（細胞株），前立腺（組織），腎臓（組織），および腎臓腺癌（細胞株）。

【0392】

2. SGP060（配列番号7）

非対称方法における最高の発現は腫瘍試料であった。これらは異なる腫瘍タイプを表すが，種々の肺癌試料において一貫して非常に高い発現が認められた。この遺伝子は肺癌において重要なオンコジンであるかもしれない。正常組織においては，脳組織試料および胎児腎臓において最も高く発現されている。選択されたクラスターおよびこのホスファターゼの発現レベルにしたがうそのランキングは以下に示される：

最高平均発現によるランキングクラスター（非対称データ）：

- ・クラスター1（2メンバー）．腫瘍群のみ：肺（組織）および肺癌腫（細胞株）。
- ・クラスター2（3メンバー）．腫瘍群：肺（組織）および卵巣腺癌（細胞株）；および正常群：前立腺（組織）。
- ・クラスター3（3メンバー）．腫瘍群のみ：肺（組織），神経芽細胞腫（組織），および結腸癌腫（細胞株）。
- ・クラスター4（8メンバー）．腫瘍群：MG（組織），smc（細胞株），神経膠芽細胞腫（細胞株），肺大細胞癌腫（細胞株），内皮（組織），原発性腎臓細胞癌腫（細胞株），および肺（組織）；および正常群：脳（組織）。
- ・クラスター5（10メンバー）．腫瘍群：肺（組織），肺への悪性黒色腫転移（細胞株），結腸腺癌（細胞株），腎臓（細胞株），未知試料（MKポリA+），乳（細胞株），腎臓原発性明細胞癌腫転移（細胞株），卵巣（組織），および神経芽細胞腫（ケラチノサイト細胞株）；および正常群：胎児腎臓（組織）。

【0393】

3. SGP018（配列番号4）

非対称方法にしたがえば，この遺伝子は腫瘍試料でより高く発現されており（

正常試料と比較して)、このパターンは、組織の間および細胞株試料のプールの間で一致しており、統計学的に有意であった(表9)。この遺伝子は広範な範囲の腫瘍タイプにわたり非常に高く発現しており、神経膠芽細胞腫および卵巣癌において特に重要でありうる。KAPと同様に、このホスファターゼは、マーカーとしておよび治療において優れた標的であるかもしれない。最高平均発現によるランキングクラスター(非対称データ)：

- ・クラスター1(単集合)：腫瘍群：神経(組織)。
- ・クラスター2(3メンバー)：腫瘍群のみ：HNS(組織)、腎臓腺癌(細胞株)、および卵巣(細胞株)。
- ・クラスター3(5メンバー)：腫瘍群のみ：悪性黒色腫、肺への転移(細胞株)、結腸(細胞株、3mMHUで処理)、卵巣(細胞株、10 μ Mシスプラチンで処理)、神経(細胞株、10 μ Mシスプラチンで処理)、およびPML末梢血、前骨髄球白血病(細胞株)。
- ・クラスター4(11メンバー)：腫瘍群：結腸(細胞株、10 μ Mシスプラチンで処理)、乳(細胞株)、内皮細胞(細胞株、低酸素症についてHeLa25XDEF-MESで処理、4時間)、未知試料(未知)、子宮頸部(細胞株、400ng/mlのnoccoで48時間処理)、腎臓(組織)、肺(組織)、肺(組織)、内皮細胞(細胞株)、および肺(組織)；および正常群：HUVEC(細胞株、10mnPDGF刺激で処理)。
- ・クラスター5(27メンバー)：腫瘍群：腎臓癌腫(細胞株)、肺(組織)、神経(細胞株、10 μ Mシスプラチンで処理)、肺(組織)、骨(細胞株)、乳(細胞株)、肺(組織)、肺(細胞株、3mMHUで処理)、神経(細胞株、400ng/mlのnoccoで24時間処理)、内皮細胞(細胞株、低酸素症についてHeLa25XDEF-MESで処理、0時間)、卵巣(細胞株、2 μ MAUR2阻害剤で処理)、乳(細胞株、正常/10%FBSで処理)、乳(細胞株、2 μ MAUR2阻害剤で処理)、乳(細胞株、200 μ Mミモシンで処理)、骨(細胞株、低血清/0.1%FBSで処理)、結腸(細胞株、10 μ Mシスプラチンで処理)、子宮頸部(細胞株、低血清/0.1%FBSで処理)、内皮細胞(細胞株)、腎臓(組織)、膵臓(組織)、および腎臓(細胞株)；正常群：

内皮細胞（細胞株，H U V E C V E G F + 5 4 1 6 で処理，2 4 時間），肺（組織），内皮細胞（細胞株，H U V E C 未刺激 / 対照），および胃（結腸組織）。

【0394】

2) 多数組織発現プロット (MTE)

MTE (多数組織発現) プロットは，Clontech Laboratories, Inc. から入手した (表6を参照)。これらのプロットは，正常ヒト組織およびヒト細胞株に由来する84個の整列したcDNA試料および対照を含んでいた。発現プロットを0.1mg/mlの変性サケ精子DNAを含むExpressHybハイブリダイゼーション溶液 (Clontech Laboratories) で65℃で2時間プレハイブリダイズさせた。放射性DNAプローブは，ランダムプライミングDNA標識キット (Roche) を用いて調製した。精製したDNAフラグメント (100ng) をキットのプロトコルを用いて250µCiの³²P標識dCTPで45分間標識した。スピンカラム (ProbeQuant G50マイクロカラム, Amersham Pharmacia, Inc.) を用いて取り込まれなかったヌクレオチドを除去した。3分間煮沸することにより変性させた後，プローブをプレハイブリダイゼーション溶液に加え，プロットを65℃で20時間ハイブリダイズさせた。次にプロットを15mM NaCl，1.5mMクエン酸ナトリウム，0.1%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を含む溶液で65℃で4回各15分間洗浄し，ホスファイメージャースクリーンに露光して定量した。

【0395】

結果

SGP012 (配列番号11，配列番号23をコード) は，以下の組織で最も高く発現されている：精巣；小脳，右；結腸，下向；小脳，左；リンパ節；バーキットリンパ腫；ダウジ；および乳腺。この発現のパターンは，SGP012が中枢神経系 (小脳発現)，免疫系疾病 (リンパ節，バーキットリンパ腫，およびダウジはすべて免疫系組織である)，または乳癌 (組織乳における発現から) の疾病において役割を果たすかもしれないことを示唆する。

【0396】

SGP002 (配列番号2, 配列番号14をコード)は, 以下の組織で最も高く発現されている: 副腎; 胎盤; 前立腺; 唾液腺; 乳腺; 下垂体。前立腺および乳における発現は, このホスファターゼがこれらの組織の癌において役割を果たすことを示すかもしれない。副腎における発現は, 副腎により制御される代謝性プロセス, 例えばストレス応答において役割を果たすことを示すかもしれない。

【0397】

実施例4: 哺乳動物蛋白質ホスファターゼの染色体位置

いくつかの情報源を用いて, 本発明の遺伝子のそれぞれの染色体上の位置に関する情報を得た。最初に, 核酸配列の受託番号を用いてUnigeneデータベースを検索した。Unigeneサーチエンジンを含むサイトは, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/Hs.Home.html>である。Unigeneデータベース中のマップ位置の情報は, いくつかの情報源, 例えば, the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html>), The Genome Database (<http://gdb.infobiogen.fr/gdb/simpleSearch.html>), および the Whitehead Institute human physical map (http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/sts_info?database=release) から得た。UnigeneがESTをマップしなかった場合には, 既にマップされている配列を含むデータベース, 例えばdbstsおよびhtgs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blastdatabases.html>) に対して目的とする遺伝子についての核酸をクエリーとして用いた。核酸配列はNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast>) でBLAST-2を用いて検索し, これを用いてdbstsまたはhtgsのいずれかにクエリーを行った。これらの方法のいずれかにより細胞遺伝学的領域を同定した後, OMIMを細胞遺伝学的位置で検索することにより,

疾病との関連を確立する。OMIMは、疾病により系統づけられた細胞遺伝学的マップ位置の検索可能なカタログを維持する。また、細胞遺伝学的領域についての入手可能な文献の徹底的な検索は、Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>) を用いて行う。マップされた部位とヒト癌において見いだされる染色体異常との関連についての参考文献は、Knuutila, et al., *Am J Pathol*, 1998, 152: 1107-1123に見いだすことができる。結果は上述の核酸の節で議論される。

【0398】

実施例5：一塩基多型 (SNPs) 候補

材料および方法

ヒトDNAにおける最も一般的な変種は一塩基多型 (SNPs) であり、これは、約100 - 300塩基に1回生ずる。SNPsは大規模の関連遺伝学研究を容易にすると予測されているため、最近、SNPの発見および検出に多大な興味をもたられている。本明細書に記載される遺伝子の候補SNPsは、核酸配列を公共のデータベースに登録されているSNPsを含む配列に対してblastn検索することにより同定した (dbSNP, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snpblastpretty.html>)。SNP含有配列についてdbSNP受託番号が与えられている。SNPsはまた、発現遺伝子 (dbEST, NRNA) およびゲノム配列 (すなわちNRNA) のいくつかのデータベースを一塩基対ミスマッチについて比較することにより同定した。結果は、表2の"SNPs"のカラムに示される。これらは候補SNPsである。ヒト集団におけるこれらの実際の頻度は決定していない。以下のコードはそれぞれのDNA配列を表す標準である：

G = グアノシン

A = アデノシン

T = チミジン

C = シチジン

R = GまたはA, (プリン)

Y = CまたはT, (ピリミジン)
 K = GまたはT, (ケト)
 W = AまたはT, (弱) (2つの水素結合)
 S = CまたはG, (強) (3つの水素結合)
 M = AまたはC, (アミノ)
 B = C, GまたはT (すなわち, A以外)
 D = A, GまたはT (すなわち, C以外)
 H = A, CまたはT (すなわち, G以外)
 V = A, CまたはG (すなわち, T以外)
 N = A, C, GまたはT, (任意)
 X = A, C, GまたはT
 相補的DNA鎖

【表16】

```

GATCRYWSKMBVDHNX
+++++
CTAGYRSWMKVBHDNX
  
```

【0399】

例えば, 2つのバージョンの遺伝子が存在し, 一方は所定の位置に"C"を有し, 他方は同じ位置に"T"を有する場合, その位置はYと表され, これはCまたはTを意味する。表1においては, SGP002についてSNPのカラムには"1165 = R"と記載されており, これは, 位置1165において多型が存在することを意味する。この位置は, 場合によりGを, 場合によりAを含む (RはAまたはGを表す)。SNPsは, 遺伝子に付随する遺伝性の特徴を同定するために重要であろう。

【0400】

結果

SGP006は位置6222に一塩基多型を有する: 6222 = R (ccaaacataagtggcacar)。dbSNP受託番号はrs881179で

ある。このSNPは3'非翻訳領域に生ずる。

【0401】

SGP018は位置1161に一塩基多型を有する；1161 = S (c a t c t a c c c c a a t g a s)。dbSNP受託番号はss1765940である。このSNPによりペプチド配列が変化する：アミノ酸番号183は、ヌクレオチド549 = Gのときグルタミン酸であることができ；またはアミノ酸183はヌクレオチド549 = Cであるときアスパラギン酸であることができる。いずれのアミノ酸も酸性であるためこの変化はかなり保存的であるが、酵素の生物学を変更する可能性がある。第2のSNPはサイレントである：2929 = M (a g a a g a t g t c t g a g t a c m)，dbSNP | ss1765941。この位置がCまたはAのいずれであっても、アミノ酸位置977はグリシンである。

【0402】

SGP008は位置871に一塩基多型を有する：871 = S (c a g c a g c c t c c g a g g g a a c c s)。このSNPのdbSNPにおける受託番号はss1389419である。これは非サイレント変化であり、位置291は、ヌクレオチド871 = Gのときバリンであり、ヌクレオチド871 = Cのときロイシンである。この変化は酵素の生物学を変更する可能性がある。

【0403】

実施例6：哺乳動物蛋白質ホスファターゼをコードするcDNAの単離

材料および方法

新規クローンの同定

総RNAは、原発性腫瘍、正常および腫瘍細胞株、正常ヒト組織、およびソートしたヒト造血細胞細胞からChomczynskiおよびSacchi (P. Chomczynski and N. Sacchi, Anal. Biochem. 162, 156 (1987))のグアニジン塩/フェノール抽出プロトコルを用いて単離する。これらのRNAを用いて、Superscript Pre Amplification System (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD; Gerard, GF et al. (1989), FOCUS 11, 66)を用いて、製造元により推奨される条件で一本鎖cDN

Aを生成する。典型的な反応においては、60 μ lの反応容量中で10 μ gの総RNAおよび1.5 μ gのオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用いる。生成物をRNase Hで処理し、H₂Oで100 μ lに希釈する。続くPCR増幅のためには、1-4 μ lのこのsscDNAを各反応において用いる。

【0404】

縮重オリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems 3948 DNA合成機で確立されたホスホルアミダイト化学を用いて合成し、エタノールで沈澱させ、精製せずにPCR用に用いる。これらのプライマーは、いくつかの蛋白質ホスファターゼの触媒ドメイン中の保存モチーフのセンスおよびアンチセンス鎖に由来する。縮重ヌクレオチド残基の表示は以下のとおりである：N = A, C, G, またはT；R = AまたはG；Y = CまたはT；H = A, CまたはT, Gではない；D = A, GまたはT, Cではない；S = CまたはG；およびW = AまたはT。

【0405】

PCR反応は、多数の一本鎖cDNAに適用される縮重プライマーを用いて行う。プライマーをそれぞれ最終濃度5 μ Mで、10mM TrisHCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 各200 μ Mデオキシヌクレオシド三リン酸, 0.001%ゼラチン, 1.5U AmpliTaq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer/Cetus), および1-4 μ gのcDNAを含む混合物に加える。95 °Cで3分間変性させた後、サイクルの条件は、94 °Cで30秒間, 50 °Cで1分間, および72 °Cで1分45秒間を35サイクルである。300-350bpの間に移動したPCRフラグメントをGeneCleanキット(Bio101)を用いて2%アガロースゲルから単離し、製造元のプロトコルにしたがってpCRIIベクター(Invitrogen Corp. U.S.A.)中にT-Aクローニングする。

【0406】

Qiagenカラムを用いるミニプラスミドDNA調製用にコロニーを選択し、サイクルシーケンシング染料ターミネータキットおよびAmpliTaq DNAポリメラーゼ, FS(ABI, Foster City, CA)を用いてプ

ラスミドDNAを配列決定する。配列決定反応生成物はABI Prism 377 DNAシーケンサーにかけ、BLASTアラインメントアルゴリズム (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10) を用いて分析する。

【0407】

追加のPCR戦略を用いて、正確なまたはほぼ正確なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて種々のPCRフラグメントまたはESTを接続する。PCR条件は上述したとおりであるが、ただし、アニーリング温度は、式： $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ を用いて各オリゴ対について計算する。

【0408】

cDNAクローンの単離：

ヒトcDNAライブラリをホスファターゼ関連遺伝子に対応するPCRまたはESTフラグメントで探索する。プローブをランダムプライミングにより ^{32}P で標識し、ライブラリスクリーニングの標準的手法にしたがって、 2×10^6 cpm/mLで用いる。プレハイブリダイゼーション(3時間)およびハイブリダイゼーション(一夜)は、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、 2.5% 硫酸デキストラン、 $50 \text{ mM Na}_2\text{PO}_4 / \text{NaHPO}_4$ 、 $\text{pH } 7.0$ 、 50% ホルムアミド、 100 mg/mL 変性サケ精子DNA中で 42°C で行う。ストリンジェントな洗浄は、 65°C で、 $0.1 \times \text{SSC}$ および 0.1% SDS中で行う。DNA配列決定は、サイクルシーケンシング染料ターミネータキットを用い、AmpliTaq DNAポリメラーゼFS (ABI, Foster City, CA)を用いて両方の鎖について行う。配列決定反応生成物をABI Prism 377 DNAシーケンサーにかける。

【0409】

実施例7：蛋白質ホスファターゼ遺伝子発現

発現ベクターの構築

ヒトcDNAのいくつかから発現構築物を作成する：a) pCDNA発現ベクター中の完全長クローン；b) GST発現カセットのC末端に融合させた新規ホスファターゼの触媒ドメインを含むGST融合構築物；およびc) pCDNAベ

クター中に挿入されたホスファターゼドメイン中の予測触媒部位に C y s から S e r (C から S) 変異を含む完全長クローン。

【0410】

ホスファターゼの " C から S " 変異体は優性負の構築物として機能するかもしれないが、これらの新規ホスファターゼの機能を解明するために用いられる。

【0411】

実施例8：蛋白質ホスファターゼに対する特異的免疫試薬の作成

材料および方法

単離されたホスファターゼポリペプチドに対応する K L H - または M A P - コンジュゲート化合物ペプチドに対する特異的免疫試薬をウサギで生成させる。C 末端ペプチドをグルタルアルデヒドで K L H とコンジュゲートさせ、遊離 C 末端を残す。内部ペプチドは、ブロックされた N 末端を用いて M A P - コンジュゲートさせる。追加の免疫試薬はまた、細菌で発現させた各新規 P T P または S T P の細胞質ドメインを含む G S T 融合蛋白質でウサギを免疫することにより生成することができる。内因性起源について試験する前に、最初に、種々の免疫血清を、組換え蛋白質に対する反応性および選択性について試験する。

【0412】

ウエスタンブロット

S D S P A G E 上の蛋白質をイモビロン膜に移す。洗浄緩衝液は P B S T (標準的リン酸緩衝化食塩水, p H 7 . 4 + 0 . 1 % T r i t o n X - 1 0 0) である。ブロッキングおよび抗体インキュベーション緩衝液は P B S T + 5 % ミルクである。抗体希釈は 1 : 1 0 0 0 から 1 : 2 0 0 0 の範囲である。

【0413】

実施例9：蛋白質ホスファターゼの組換え発現および生物学的アッセイ

材料および方法

哺乳動物細胞におけるホスファターゼの過渡的発現

S T E 2 0 関連ホスファターゼ構築物を含む p c D N A 発現プラスミド (1 0 μ g D N A / 1 0 0 m m プレート) をリポフェクタミン (G i b c o B R L) とともに 2 9 3 細胞中に導入する。72時間後、細胞を 0 . 5 m L の可溶化緩衝液

(20 mM HEPES, pH 7.35, 150 mM NaCl, 10% グリセロール, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM フッ化フェニルメチルスルホニル, 1 μg/mL アプロチニン) 中に回収する。試料アリコートをして6% アクリルアミド / 0.5% ビスアクリルアミドゲルのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で分離し、電気泳動的にニトロセルロースに移す。非特異的結合は、プロットをBlotto (5% w/v 無脂乾燥ミルクおよび0.2% v/v Nonidet P-40 (Sigma)) を含有するリン酸緩衝化食塩水) 中でプレインキュベートすることによりブロックし、種々の抗ペプチドまたは抗GST融合蛋白質特異的抗血清を用いて組換え蛋白質を検出した。

【0414】

インビトロホスファターゼアッセイ

ホスファターゼ発現構築物でトランスフェクトした3日後、10 cm プレートの293細胞をPBSで洗浄し、氷上でホスファターゼ阻害剤を含む2 mLのPBSTDsで可溶化する(10 mM NaHPO₄, pH 7.25, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% デオキシコール酸, 0.1% SDS, 0.2% アジ化ナトリウム, 1 mM NaF, 1 mM EGTA, 4 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1% アプロチニン, 5 μg/mL ロイペプチン)。細胞断片を遠心分離(12000 × g, 15分間, 4℃)により除去し、溶解物をプロテインAセファロースの1:1スラリー50 μlとともにそれぞれ1時間2回インキュベートすることにより前精製する。0.5 mLの精製上清を、10 μlのプロテインA精製ホスファターゼ特異的抗血清(GST融合蛋白質または抗ペプチド抗血清から生成) プラス50 μlのプロテインA-セファロースの1:1スラリーで、4℃で2時間インキュベートする。次にビーズをPBSTDs中で2回、HNTG (20 mM HEPES, pH 7.5 / 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10% グリセロール) 中で2回洗浄する。

【0415】

セファロースビーズ上の免疫精製ホスファターゼを20 μlのHNTG + 30

mM $MgCl_2$, 10mM $MnCl_2$, および $20 \mu Ci [^{32}P]ATP$ ($3000 Ci / mmol$) 中に再懸濁する。ホスファターゼ反応は室温で30分間実施し, 50mM EDTAを補充したHNTGを加えることにより停止させる。試料をHNTG中で6回洗浄し, SDS試料緩衝液中で5分間煮沸し, 6% SDS - PAGEおよび続くオートラジオグラフィーにより分析する。リン酸化アミノ酸の分析は, SDS - PAGEゲルから切り出した ^{32}P - 標識バンドの標準的2D法により行う。細菌で発現させたホスファターゼのGST融合構築物についても同様のアッセイを行う。

【0416】

実施例10：サザンブロットィングによる遺伝子増幅の証明

材料および方法

ナイロン膜はBoehringer Mannheimから購入する。変性溶液は, 0.4M NaOHおよび0.6M NaClを含む。中和溶液は, 0.5M Tris - HCl, pH7.5および1.5M NaClを含む。ハイブリダイゼーション溶液は, 50%ホルムアミド, 6XSSPE, 2.5Xデンハルト溶液, 0.2mg/mL変性サケDNA, 0.1mg/mL酵母tRNA, および0.2%ドデシル硫酸ナトリウムを含む。制限酵素はBoehringer Mannheimから購入する。放射性標識プローブは, StratageneのPrime - it IIキットを用いて調製する。プローブテンプレートに用いるベータアクチンDNAフラグメントはClontechから購入する。

【0417】

種々の腫瘍細胞株(例えば, MCF - 7, MDA - MB231, Calu - 6, A549, HCT - 15, HT - 29, Colo205, LS - 180, DLD - 1, HCT - 116, PC3, CAPAN - 2, MIA - PaCa - 2, PANC - 1, AsPc - 1, BxPC - 3, OVCAR - 3, SKOV3, SW626およびPA - 1), および2つの正常細胞株から, ゲノムDNAを単離する。

【0418】

各ゲノムDNA試料の10 μ gのアリコートを用いてEcoRI制限酵素で消化し,

別の10 µgの試料をHindIII制限酵素で消化する。制限酵素消化したDNA試料を0.7%アガロースゲルに負荷し、電気泳動分離した後、標準的方法によりDNAをナイロン膜にキャピラリー移動させる(Sambrook, J. et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)。

【0419】

実施例11：ファージディスプレイによる蛋白質-蛋白質相互作用の検出

材料および方法

ファージディスプレイは、所望のおとりに対する親和性に基づいて分子相互作用を単離する方法を提供する。ファージ被覆蛋白質への融合としてクローニングされたcDNAフラグメントは、ファージの表面にディスプレイされる。おとりと相互作用するファージをアフィニティー精製により濃縮し、個々のクローンからの挿入DNAを分析する。

【0420】

T7ファージディスプレイライブラリ

すべてのライブラリは、T7 Select 1-1bベクター(Novagen)中で、製造元の指針にしたがって構築する。

【0421】

おとりの提示

おとりとして用いるべき蛋白質ドメインは、GSTへのC末端融合体として作成し、E. coliで発現させる。ペプチドは化学的に合成し、長鎖スパーサービオチン試薬を用いてN末端でビオチン化する。

【0422】

選択

PanMixおよびE. coli阻害剤カクテル(Sigma P-8465)を補充した、新たに調製したライブラリ(10^{10} - 10^{12} pfu)のアリコートをし、固定化したおとりとともに室温で1 - 2時間インキュベートする。未結合ファージを洗浄緩衝液でよく洗浄する(少なくとも4回)。3 - 4ラウンドの選択

の後、結合したファージを100 μ lの1%SDS中に溶出し、アガロースプレートに播種して、単一ブランクを得る。

【0423】

挿入DNAの同定

個別のブランクを25 μ lの10mMEDTA中に取り出し、70 $^{\circ}$ Cで10分間加熱することによりファージを破壊する。2 μ lの破壊ファージを50 μ lのPCR反応混合物に加える。35ラウンドの熱サイクル(94 $^{\circ}$ C, 50秒間; 50 $^{\circ}$ C, 1分間; 72 $^{\circ}$ C, 1分間)により挿入DNAを増幅する。

【0424】

緩衝液の組成

10xPanMix

5%TritonX-100

10%無脂乾燥乳(Carnation)

10mMEGTA

250mMNaF

250 μ g/mLヘパリン(sigma)

250 μ g/mL, 剪断し, 沸騰させたサケ精子DNA(sigma)

0.05%アジ化ナトリウム

PBS中で調製する。

【0425】

洗浄緩衝液

PBS, 以下のもので補充:

0.5%NP-40

25 μ g/mLヘパリン

PCR反応混合物

1.0mL 10xPCR緩衝液(Perkin-Elmer, 15mMMgを含む)

各0.2mLのdNTPs(10mM保存液)

0.1mL T7UPプライマー(15pmol/L)GGAGCTGTCGT

A T T C C A G T C

0.1 mL T7 DNプライマー (15 pmol / L) A A C C C C T C A A G

A C C C G T T T A G

0.2 mL 25 mM MgCl₂ または MgSO₄ , EDTA 補償用

蒸留水で10 mL とする

反応液50 µl あたり1ユニットのTaqポリメラーゼを加える

ライブラリ: T7 Select 1 - H441

【0426】

化合物の評価

所定の任意の一連の化合物について、生物学的活性のスペクトルを観察することができることが理解されるであろう。1つの好ましい態様においては、本発明は、細胞シグナル伝達に関連する蛋白質酵素、好ましくは蛋白質ホスファターゼ、最も好ましくは蛋白質チロシンホスファターゼを調節する能力を示す化合物に関する。以下に記載されるアッセイを用いて、最適な程度の所望の活性を示す化合物を選択する。

【0427】

本明細書において用いる場合、"最適な程度の所望の活性"との語句は、疾患に罹患している動物またはヒト患者に治療上有効量の本発明の化合物を可能な最低の投与量で与えるような、細胞シグナル伝達を媒介し特定の疾患と関連する蛋白質酵素に対する最高の治療指数（上で定義）を表す。

【0428】

阻害的活性を決定するためのアッセイ

当該技術分野において知られる種々の方法を用いて、本発明の化合物による蛋白質酵素、特に蛋白質ホスファターゼの活性の阻害を同定、評価またはアッセイすることができる。例えば、限定されないが、ホスファターゼに関しては、そのようなアッセイは、培養標的細胞を化合物に暴露し、(a)細胞溶解物を生化学的に分析して、リン酸化された蛋白質のレベルおよび/または種類を評価する；または(b)試験物質に暴露されていない対照細胞と比較して、処理細胞における発現型のまたは機能的変化を評点することを含む。

【0429】

シグナル伝達レセプターの天然のリガンドの模倣体を同定または評価する際には、細胞を本発明の化合物に暴露し、天然のリガンドにのみ暴露された正対照、および化合物にも天然のリガンドにも暴露されていない負対照と比較する。天然のリガンドの非存在下で基底レベルでリン酸化されることが知られているレセプター、例えばインスリンレセプターについては、アッセイはリガンドの非存在下で行うことができる。リガンド誘導性シグナル伝達の阻害剤または促進剤を同定または評価する際には、細胞を天然のリガンドの存在下で本発明の化合物に暴露し、本発明の化合物に暴露されていない対照と比較する。

【0430】

以下に記載されるアッセイは、本発明の化合物がホスファターゼ活性を阻害する能力を評価する一次スクリーニングとして用いることができる。また、アッセイを用いて、ある範囲の濃度、例えば100 μ M - 1 pMの範囲を試験し、リン酸化またはシグナル伝達の量が対照と比較して50%減少するか増加する濃度 (IC_{50}) を計算することにより、化合物の相対的効力を評価することができる。

【0431】

生化学的アッセイ

1つの態様においては、シグナル伝達の間チロシン残基においてリン酸化または脱リン酸化される基質分子を有する標的細胞を本発明の化合物および放射性標識したリン酸に暴露し、その後、これを溶解して目的とする基質を含む細胞内容物を放出させる。基質は、ドデシルリン酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 技術を一次元または二次元で用いて細胞溶解物の蛋白質成分を分離し、X線フィルムに暴露してリン酸化された蛋白質の存在を検出することにより分析することができる。放射性標識を用いない同様の手法においては、SDS-PAGEにより分離した蛋白質成分をニトロセルロース膜に移し、抗ホスホチロシン (抗pTy r) 抗体を用いてpTy rの存在を検出する。あるいは、細胞溶解物を固体支持体に結合した基質特異的結合抗体とともにインキュベートすることにより目的とする基質を最初に単離し、次に非結合細胞成分を洗い流し、抗pTy r抗体により固体支持体上のpTy rの存在または非存在

を評価することが好ましい。この好ましい方法は、自動化ロボットシステムによりマイクロタイタープレートフォーマットで容易に行うことができ、このことにより、大量の試料を適当な短い時間枠で試験することができる。

【0432】

抗pTy r抗体は、放射性物質で標識することにより検出することができ、これはオートラジオグラフィーによるその検出を容易にする。あるいは、抗pTy r抗体を酵素、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲート化させ、次にその酵素の適当な基質を加えることにより検出する。基質の選択は当業者には明らかである。さらに別の方法は、pTy r抗体を認識する二次抗体と反応させることにより抗pTy r抗体を検出することを含む。この二次抗体は、放射性物質または先に記載した酵素で標識する。当該技術分野において知られる、抗体を検出する他の任意の方法を用いることができる。

【0433】

上述の方法はまた、シグナル伝達基質分子を含む細胞溶解物およびホスファターゼが本発明の化合物およびキナーゼと混合されている無細胞系において用いることもできる。基質は、アデノシン三リン酸(ATP)を加えてキナーゼ反応を開始することによりリン酸化される。化合物の活性を評価するためには、反応混合物をSDS-PAGE手法により分析することができ、またはこれを固体支持体に結合した基質-特異的結合抗体に加えて、分離されたまたは捕捉された基質について上述した検出方法を実施して、pTy rの存在または非存在を評価することができる。結果を化合物を加えない反応混合物から得られた結果と比較する。無細胞系には、天然のリガンドまたはその種類についての知識は必要ではない。例えば、Posner et al., (米国特許5,155,031)は、基質としてインスリンレセプターを、標的細胞としてラット脂肪細胞を用いて、過バナジン酸がPTP活性を阻害する能力を示すことを記載する。Burke et al. (1994, Biochem Biophys. Res. Comm., 204:129-134)は、自己リン酸化インスリンレセプターおよび組換えPTP1Bを用いてホスホチロシル模倣体の阻害的活性を評価することを記載する。

【0434】

基質蛋白質のリン酸化または脱リン酸化を測定することに加えて、第2のメッセンジャーの産生の活性化または調節、細胞のイオンレベルの変化、シグナリング分子の会合、解離または移動、遺伝子または特異的遺伝子の転写または翻訳の誘導をモニターすることができる。これらの生化学的アッセイは、これらの目的のために開発された慣用の手法を用いて行うことができる。

【0435】

生物学的アッセイ

本発明の化合物がシグナル伝達を制御するPTPの活性を調節する能力はまた、リガンド結合に関連する形態学的または機能的変化を評点することにより測定することができる。当該技術分野において知られる任意の定性的または定量的手法を適用して、シグナリング経路においてホスファターゼの制御下にある細胞プロセスを観察および測定することができる。そのような細胞プロセスには、限定されないが、同化および異化プロセス、細胞増殖、細胞分化、細胞接着、細胞移動および細胞死が含まれる。

【0436】

バナジン酸のホスファターゼ阻害剤としての種々の生物学的効果を研究するために用いられてきた手法を、本発明の化合物について用いるために適合させることができる。例えば、バナジン酸は、ラット脂肪細胞においてグルコースおよびグルコース類似体のインスリン感受性促進性輸送システムを活性化することが示されている(Dubyak et al., 1980, J. Biol. Chem., 256: 5306 - 5312)。本発明の化合物の活性は、化合物に暴露したラット脂肪細胞におけるグルコース類似体、例えば2-デオキシ-³H-グルコースの輸送の速度の増加を測定することにより評価することができる。バナジン酸はまた、インスリンがラット脂肪細胞におけるグルコース酸化に及ぼす影響を模倣する(Shechter et al., 1980, Nature, 284: 556 - 558)。本発明の化合物は、¹⁴C-グルコースの¹⁴CO₂への変換を測定することにより、グルコース酸化の刺激について試験することができる。さらに、ナトリウムオルトバナジン酸がエリスロポエチン媒介性細胞増殖に及

ばす影響は、DNA合成の間のトリチル化チミジンの取り込みにより評価して、DNA含量に基づく細胞サイクル分析により評価されている (Spivak et al., 1992, Exp. Hematol., 20:500-504)。同様に、細胞増殖において役割を果たすホスファターゼに対する本発明の化合物の活性は、細胞サイクル分析により評価することができる。

【0437】

本発明の化合物の活性はまた、シグナル伝達の機能不全により引き起こされるかこれに関連する疾患の実験モデルを用いて動物において評価することができる。例えば、本発明の化合物の活性は、非肥満性糖尿病マウス (Lund et al., 1990, Nature, 345:727-729)、BBWistar ラットおよびストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラット (Solomon et al., 1989, Am. J. Med. Sci., 297:372-376) において、インスリンレセプターシグナル伝達に及ぼす化合物の影響について試験することができる。ホスファターゼはシグナル伝達の機能不全において重要な役割を果たし、細胞トランスフォーメーションにつながりうるため、化合物の活性は、動物発癌性実験において評価することもできる。例えば、オカダイン酸 (ホスファターゼ阻害剤) は、マウス皮膚において腫瘍形成を促進することが示されている (Suganuma et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:1768-1771)。

【0438】

これらの細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータを用いて、ヒトにおいて用いるためのある範囲の投与量を処方することができる。本発明の化合物の投与量は、毒性がほとんどまたは全くない循環濃度の範囲内でなければならない。投与量は、用いられる投与量の形態および投与経路に依存して、この範囲内で様々でありうる。

【0439】

ホスホチロシン酵素結合イムノソルベントアッセイ

このアッセイを用いて、本発明の化合物がインスリンレセプター (IR) 上のホスホチロシン (pTyr) 残基の脱リン酸化を阻害する能力を試験することが

できる。当業者は、異なる標的細胞および結合抗体を用いることにより、他の基質分子、例えば血小板由来成長因子レセプターをこのアッセイにおいて用いることができることを認識するであろう。アッセイにおいて異なる基質分子を用いることにより、異なる蛋白質チロシン酵素に対する本発明の化合物の活性を評価することができる。IRの場合、内因性キナーゼ活性はインスリン結合がない場合であっても低いレベルで活性がある。したがって、IRのリン酸化を刺激するためにはインスリンは必要ではない。すなわち、化合物に暴露した後、細胞溶解物を調製し、抗インスリンレセプター抗体で被覆したマイクロタイタープレートに加えることができる。抗pTyr抗体および酵素結合二次抗体を用いて捕捉されたインスリンレセプターのリン酸化のレベルを検出する。

【0440】

化合物 - PTPのIC50を決定するためのアッセイ方法

本発明の種々の化合物の活性のレベルおよび1またはそれ以上のPTPに及ぼす影響を決定するためには、以下のインビトロアッセイ方法が好ましい。当該技術分野においてよく知られる手法を用いて、任意のPTPについて同様のアッセイを設計することができる。

【0441】

本明細書に記載される触媒的アッセイは、96 - ウェルフォーマットで行う。一般的な方法は、最初に、広範囲の緩衝液pHにわたってイオン強度の変動を最少にした3成分緩衝液系を用いて、PTPの最適pHを決定する。次に、各特異的基質 - PTP系についてミカエリス - メンテン定数、すなわちKmを決定する。次にこのKm値を化合物スクリーニングの基質反応濃度として用いる。最後に、試験PTPを種々の濃度の化合物に15分間暴露し、基質と10分間反応させる。結果はパーセント阻害対化合物濃度としてプロットし、プロットの内挿からIC₅₀を求める。

【0442】

以下の材料および試薬を用いた。

1. 特に示さない限り、アッセイ緩衝液をすべてのアッセイ溶液の溶媒として用いた。

成分	濃度
アセテート (Fisher Scientific A38,500)	100mM
ビス-tris (Sigma B-7535)	50mM
Tris (Fisher Scientific BP152-5)	50mM
グリセロール (Fisher Scientific BP229-1)	10% (v/v)
* DTT使用直前に1mMを加える	
2. 96ウエルイージーウォッシュプレート (Costar 3369)	
3. p-ニトロフェニルホスフェート (pNPP) (Boehringer Mannheim 738-379)	
4. フルオレセインジホスフェート (FDP) (Molecular Probes F-2999)	
5. 0.22 μねじ蓋濾過システム500ml (Millipore SCGPU 05RE)	
6. 10N NaOH (Fisher Scientific SS255-1)	
7. 10N HCl (Fisher Scientific A144-500)	
8. 化合物は, DMSO (Sigma D-5879) に5または10mM濃度で溶解し, 小さいアリコートで -20 で保存した。	

【0443】

方法

すべてのアッセイは, pNPPまたはFDPを基質として用いて行う。用いた各PTPについて最適pHを決定する。

【0444】

PTPアッセイ

PTPase活性は, 適当な濃度のpNPPまたはFDPを基質として含む1

00 μ lの反応混合物中で25 でアッセイする。反応は、PTPを加えることにより開始し、10分後に50 μ lの1N NaOHを加えることにより停止する。基質の非酵素的加水分解は、酵素を加えない対照を測定することにより補正する。生成したp-ニトロフェノールの量は、410 nmの吸収から決定する。速度論的パラメータKmを決定するためには、種々の基質濃度で初速度を測定し、データをミカエリス等式

$$\text{速度} = (V_{\max} \times [S]) / (K_m + [S])$$

[S] = 基質反応濃度

に適合させる。

【0445】

阻害実験

化合物がPTPに及ぼす影響は、25 でpNPPまたはFDPを基質として用いて評価する。PTPを種々の濃度の化合物とともに15分間プレインキュベートする。次に基質を固定濃度（通常は先に計算されたKmと等しい）で加える。10分後、NaOHを加えて反応を停止する。pNPPの加水分解は、Bio tek Powerwave 200マイクロプレートスキャン分光光度計で410 nmで追跡する。パーセント阻害は、以下のように計算する：

$$\text{パーセント阻害} = [(\text{対照シグナル} - \text{化合物シグナル}) / \text{対照シグナル}] \times 100\%$$

次に、パーセント阻害対化合物濃度のプロットを内挿することによりIC50を決定する。

【0446】

細菌GST-PTP融合蛋白質発現のために設計したプラスミドは、PCR生成ヒトPTPフラグメントをpGEXベクター(Pharmacia Biotech)中に挿入することにより作成する。次に、これらの構築物のいくつかを用いて、Sf-9昆虫細胞における発現用にホスファターゼをpFastBac-1中にサブクローニングする。PTP遺伝子の最初の増幅に用いたオリゴヌクレオチドは以下に示される。cDNAsは、Clontechから購入したRNAで、Gilbo BRL superscriptプレ増幅システムを用いて

調製する。

【0447】

結論

当業者は、本発明は、その目的を実施し、記載される結果および利点、ならびに本明細書に固有のものを得るのによく適合していることを容易に理解するであろう。本明細書に記載される分子複合体および方法、手順、処理、分子、特定の化合物は、現在のところ好ましい態様の代表的なものであり、例示的なものであって、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明に対して種々の置換および改変をなすことができることを容易に理解するであろう。

【0448】

本明細書において言及されるすべての特許および刊行物は、本発明の属する技術分野の技術者のレベルを示す。すべての特許および刊行物は、それぞれの刊行物が特定の個々に本明細書の一部としてここに引用されることと同じ程度に、本明細書の一部として引用される。

【0449】

本明細書に例示的に記載されている発明は、本明細書に特定的に開示されていない任意の要素または限定なしでも適切に実施することができる。すなわち、例えば、本明細書における各例において、"・・・を含む"、"・・・から本質的になる"および"・・・からなる"との用語は、他の2つのいずれかと置き換えることができる。本明細書において用いた用語および表現は、説明の用語として用いるものであり、限定ではない。そのような用語および表現の使用においては、示されかつ記載されている特徴またはその一部の等価物を排除することを意図するものではなく、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲中で種々の変更が可能であることが理解される。すなわち、好ましい態様および任意の特徴により本発明を特定的に開示してきたが、当業者には本明細書に記載される概念の変更および変種が可能であり、そのような変更および変種も特許請求の範囲に定義される本発明の範囲内であると考えられることが理解されるべきである。

【0450】

さらに、発明の特徴および局面がマーカッシュグループの用語で記載されている場合、当業者は、本発明が、マーカッシュグループのメンバーの個々のメンバーまたはサブグループに関してもまた記載されていることを認識するであろう。例えば、Xが、臭素、塩素およびヨウ素からなる群より選択されるとして記載されている場合、Xが臭素である特許請求の範囲およびXが臭素および塩素である特許請求の範囲も完全に記載されている。

【0451】

遺伝コードの縮重の観点から、核酸の他の組み合わせもまた本明細書のペプチドおよび蛋白質をコードする。例えば、GCT, GCC, GCA, GCGの4つの核酸配列はすべてアミノ酸アラニンをコードする。したがって、あるアミノ酸について平均で3つのコドンが存在し、100アミノ酸の長さのポリペプチドは平均で 3^{100} 、すなわち 5×10^{47} 種類の核酸配列によりコードされるであろう。すなわち、日常的な方法を用いて過度の実験なしに、核酸配列を改変して第1の核酸配列によりコードされるものと同じポリペプチドをコードする第2の核酸配列を形成することができる。すなわち、特許請求の範囲に記載されるペプチドおよび蛋白質をコードするすべての可能な核酸もまた、コドン使用、特にヒトにおいて好ましいものを完全に考慮してこれらがすべて書き出されているように、本明細書に完全に記載されている。さらに、ポリペプチドの有意な活性が変更しない配列の領域内において、ポリペプチドのアミノ酸配列、またはそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列の変更が生ずるよう設計しまたは選択することができる。例えば、ポリペプチドの活性部位と離れたターン中で、アミノ酸変化を生じさせることができる。また、欠失（例えば活性部位に影響を与えないポリペプチドのセグメントまたはそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列を除去する）および付加（例えば、活性部位の機能に影響を与えずに、ポリペプチド配列により多くのアミノ酸を付加する、例えばGST融合蛋白質を形成する、または活性部位の機能に影響を与えずにそのようなポリペプチドをコードする対応する核酸配列に付加する）もまた本発明の範囲内である。ポリペプチドに対するそのような変更は、当業者が日常的な方法を用いて過度の実験なしに行うことができる。すなわち、本発明のペプチドまたは蛋白質の有意な

活性に影響を与えないと容易に決定することができるすべての可能な核酸および／またはアミノ酸配列もまた本明細書に完全に記載されている。

【0452】

本明細書においては、本発明を広くかつ一般的に記載している。一般的開示に含まれるより狭い種および亜属のそれぞれのグループもまた本発明の一部を形成する。これには、除かれたものが具体的に記載されているか否かにかかわらず、属から任意の主題を除く「ただし・・・」またはネガティブ限定を含む発明の一般的記載が含まれる。

【0453】

他の態様は以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【配列表】

SEQ ID NO:1 (SGP006)

ACGTCTGTGGCGCCCTCGCACCGCGCCGAGCCATGGCCCTGGTGACCCTGCAGCGCTCGCCACGCCCAG
 CGCCGCTCCTCCTCGGCCAGCAACAGCGAGTTGGAGGCTGGCAGCGAAGAGATCGAAAATTAACCTCA
 GCTTAAGTGAGAGCTTTTTCATGGTGAAGGCGCAGCCCTCTTCTTACAACAGGGAAGCAGCCCTCAAGGC
 CAGCGGAGCTTTCAGCACCCCCACAAGCATGCAGGTGATCTGCCCTCAACATCTTCAGGTGATGATCAACCT
 TCTGCGTTGCGAAGACAGAATCAAGCTGGCAGTGGCCCTGGAGAGCGCCTGGCGGACCGGGTCCGGTACA
 TGGTGGTGGTGTACAGCAGCGGGCGCCAGGACACCGAGGAGAATATCTTGTGGGAGTGGACTTTTCCAGT
 AAGGAAAGTAAAAGCTGCACCATTTGGGATGGTTCTCCGACTGTGGAGCGACCGAAAATCCACCTTGATGG
 AGATGGTGGTTCAGCGTGAGCACAGCAGGAAGGATGCACATATTTAAGCCTGTGTCTGTCCAGGCCATGT
 GGCTGCCCTGCAGGTGCTTCAAGGSCCTCGAAGTGGCCCGGAGGCACAACACTACTTCCCGGGGGTGT
 GCTCTCATCTGGGCTACCTACTATGAGAGCTGCATCAGCTCCGAGCAGAGCTGCATCAACGAGTGGAAACGC
 CATGCAGGACCTGGAGTCTACGCGGCCGACTCCCCCGCGCTATTTGTGGACAAGCCACTGAAGGGGAAA
 GGACCGAGCGCCTCATCAAAGCCAAGCTCCGAAGCATCATGATGAGCCAGGATCTAGAAAATGTGACTTCC
 AAGAGATTCGTAATGAATTAGAGAACAGATGAATTTAACTTGAAGGAACTCAAGGAATTTATAGACAA
 TGAGATGCTACTTATCTTGGGACAGATGGACAAGCCCTCCCTTATCTTCGATCATCTTTATCTCGGCTCTG
 AATGGAATGCATCCAATCTGGAGGAACTGCAGGGCTCAGGGGTGATTACATTTTAAATGTTACCAGAGAA
 ATCGATAATTTTTTCCCTGGCTTATTTGCATATCATAACATCCGAGTCTACGATGAAGAGACCAGACCT
 CCTCGCCACTGGAATGAAGCGTATCATTTTATAAACAAAGCGAAGAGGAACCATTTCCAAGTGCCTGGTGC
 ATTGCAAAATGGGCGTGTAGTGGCTCGGCTCCAGCTCATAGCCTATGCAATGAAGGAATTCGGCTGGCCT
 CTGGAAAAGCATATAACTATGTAAGCAGAAAGCGCAGCATCAGCGCCCAACGCGGGCTTTATGAGGCA
 GCTGTCTGAGTATGAAGGCATCTTGGATGCAAGCABAACAGCGGCACAACAAGCTGTGGCGTCAAGCAG
 ACAGCAGCCTCCAGCAGCTGTGGATGACCTTGCAGGACCTGGCGACTTCTTGGCAGAGACCCAGATGGC
 ACCCGGAAAGCCAGCTGCCCTTCTTGGATGATGCCGCCAGCCCGGCTTAGGGCCCCCTCCCTGCTG
 TTTCCGGGACTCTCAGACCCCTTCTGCCCTTCCCTGAGGATGAAACTGGCAGCTTGGTCCACCTGGAGG
 ATCCGGAGAGGGAGGCTGTGTTGGAGGAAGTGTCTCCACTGCAGAGGTGCACAGCGCCGCGCAGACGCC
 CAGCAAGGTTCCGACTCTGTGAGAAGGATGTGAAGAAGAACTAGAGTTTGGGAGTCCCAAAGGTCGGAG
 CGGCTCCTTGTGCAGGTGGAGGAGACCGAAAGGGAGGAGGGCCTGGGAGCAGGGAGGTGGGGGAGCTTC
 CAACCCAGCTCGATCAAAACCTGCTCAACTCGGAGAACCTAAACAACAACAGCAAGAGGAGCTGTCCCAAC
 GGATGGAGGATGATGCTATATTTGGGATCCTTAACAAGTGAAGCCTTCCATATAAATCCTGTGCCAGTG
 CATGTACCCTACAGCCAGCGGGGCTCCTGAGGCCTCCAGGGAGCGATGTGAGGACCCCAATGCTCCCGCA
 TCTGCACCCAGCCAGCCTTCCCTACCCACATCAGCTCCTCCCTGTGGCCACTTGGCCAGCAGGTCCCGT
 GTTCCGGAGAGCCAGCCTTCTGGCCCAACCGAACCTCCCCGTTCTACCACAGCAGGCTCCAGGAGGGC
 AGACACCAGTGGCCCTGGGGCTGGAGTGCCTTAGAGCCACCAGCCAGCCTTTTGGAACTTCCAGAGAGA
 CCCAAAAGTCTGCCAAAGTCCCTCCTTTTGAAGAAATTTCACTGTGATAGAACCCTCCAGCAGAGAA
 GTGGTAATAAAGGAAGAATCGTCACCCAGAAAGATATGAAGCCAGCCAGGACCTGAGGCTTCTGTTCAG
 TAATGAATCTGAGAAGCGACAACCAACAGCTACCTGATGCAGCACCAGGAGTCCATCATTCAGCTGCAGA
 AGGAGGCTTGGTCCGCAAGCACACCAAGAGCTAGAGCGGCTGAAGAGGCTGCCTGCAGACCCAGCACCT
 CCTCCAGGGATGGCCCTGCCAGCAGGCTGGAGGCCAGCATCCCCGAGGAGGCCAGGATCCAGCCGCGCT
 CCACGAGCTGGGCCCTGGTTATGCCAGCCAGGCGGGAGTGTGAGAAGTCAAGGGCCGCCCCCGCTT
 CATTGGAAGGAGGCTCACTGAAGAGCCCCCTCCTTTCTTCTACCGCCTGGACCACACCAGTAGTTTCTCA
 AAAGACTTTCTGAAGACCATCTGTACACCCACCTCCTTCCATGAGCTCCAACCTGACCCGGAGCTC
 CAGCAGCGATAGCATCCACAGTGTCCGTGGGAAGCCCGGGCTGGTGAAGCAGCGGCACAGGAGATTGAGA
 CCGGCTCCGGCTGGCGGGCCTCACCGTCTTCCCACTGAAGCGCTCACACTCTCTTGCAGCTGGGG
 AGTCTCACCTTCTCAACGGAAGACCTGTCCAGTGAAGCTGACCCGTCCACCGTCCGCTGACTCCAGGACAC
 CACTTTGAGTGAATCTTCTTCTTGCATGAGCCCCAGGGAACCCCGAGGGACCCAGCTGCAACCTCCAAC
 CATCAGGGAAACCCGCCCCAGAAAACCTTAAAGAGCCCTTTCGTGGATGAGCAAAAGCTGACCCGCTTTTGC
 TGGCTCAGGCTGGGCGGATATTTTCATATGATCCCTCCCTCACTTTCAGTGTGGATTTGGATCGACCCCTT
 ACATCTTGATTTCCCTTAAACGAGTGAAGTATCCTAACTTTCCCTACTCTTGCCATAGAGAGGAGGAG
 AAGAAACTAACCAACATGCAGCACAAAGAAGGGGAGCTGTCACTCGTGTGGCCTGGGAGAACCAGGACCCGC
 CGGCCAGGAGACACAAAACCTCCGCTCCACCGTGTCTTCAAGAAGAACCATGTTTTAGGAAGAAGCTGCAC
 ACATAGGCGCACACATCCAGACTTTCCTTCCGATCCTGCAGAGAGTCTGGTGGTGGCAGCCTCACCG
 CGGCACACGTTCTAGCTCATCTTGGCCCTCGCAGAAAACCTTCCGATGGCAACATTAAGTCTTACTCTGT
 TCTCGCTGGCTTTTTATTTTAAAACACACGAATGACCAAGGCTTGTCCAGGGAATAATGCTCTGTCTG
 AAAGCGTTTTTCCAAAAGAAATTTTTCGTTTTGTGTTTTGGTTGGGACCCCAAGCAGCTCAAGACTTTT
 AACCCGACAGCCCCAAGCACTGCTGAGTAAAGTCAATCAGATGAGTAGTCCCAGCTGTGTGAGCTGACT
 CTGTGCCCGAATGGTGGTGCAGGCCCTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GGTGGGAAAATGTATGGTGTGTCTCAGTTGTGTGCTAATGCTGAAGTTTAAATCTCAAGGGGAAGGGCCC

ACCTGCATGTTGAGTGTCTGCTGCTGAAACACATGATTGTGTTTAGGTTTAAAATTGCTCAAGTGTCTGG
 CTCAGGTGGTGGTCTGAGACACATCGTCTGCTGAGAGCCCAGATGCTTAGGTCCACTAGGGCCCATCTA
 GGAAGGAAAGGAGATTTACGCGGCTTCCCCGAAAGGAACGGGACTGTGGGATGCTTCCCGGATGTCTA
 CAGTTGCCCTTCCGAGTGTGAGATTACTGCTTCCCTGTTTCCCTCCAGCTCTTCCAGCAGCAGTGAAGGA
 GTATAAGAGGGATCTGTAGTCGCTGCCGCTGTGGGGGCCCCCTTAAAGACTCAGGTGAGCTCAGCCA
 GTCCCGCTGCGCCAGGCTTGAATCAAAGGTGTACGCAAGCTAGATGTCAAACATTTGAGAGAGAGGCAG
 CTTGCAAAAAGCAGAAAGGTTGAATCAGGGGTGAGCAAACTATGGCATGTGGCCCCGTGAGCTAGGAAT
 GGTTTTTCCCTCTTTAAGACAGGGCCTGGCTCTGTACCTAGGCTGGAGTACAGTAGTGCAATCATGACTCA
 CTGACGATCAACCTCCCTGGCTCAAGCGATGGCTTTTACCTTTTTAAGGAGTTGTAAAAAAGAAATAA
 TATGTGACAGAATTCATGTGGCCACAAAGCCTGAGGTACTTACTGTGAGGCCCTTGTAGAAAAAGTTGC
 TGACCCCTGGTTTTGATTTGCCACACAGGGCTGCTCATGCCCCGTGTAGGAAGAAACTGGGTAATGTGAAGC
 CCTCTGCCCTCTGACACCTAAGGCCAGACCCTTCCCTCCTCCCGACCACAAGCTTTGCCAGCCCCGCACT
 AGCCTCACCTGTGCAGGATGGAGTGGTTGCGTACATGGGGGAAGGCAGGTGAACACAGATGGCTGAAGCT
 CTTCCACAATTCATCTTGGCCCTCAGCTGGGTCCGCCAGATTAACCTCAGTGAAACCAGAAAGCCTTCAAGG
 ACCAGCTGAATTCGAAAGTGAAGTGAAGTGAAGCCATCATCTTAACATTTGCCAGAACTGTGTTCCCAAAGC
 TATTCTAGAAAGCAGCCAGGAGGGATCTGCAGGAACAAGGCTAGTTTATATTTTAACTAGTGAGCACAGT
 TTTTGCAAAAATCCTCCCTCCAGGACTTTGTCTCCTTGGAGTGATTTTTAAAAATACATACATTACTTTAT
 AGGGAGCTGTTTTTCCCACTAGTGTCAATTAATAACCTTAAAGGTGATTATCCACTTATTCCTTAAACCC
 CTGTGGGTTGTTCCCTTCCCTCAGCCAACAAGCATAGCCTCAAAAAATATCAAGTTCCGGTATGTTTT
 TGCCAAATCAAATTTTATGTGGTAGATCAATTTTTGTGTCAAATAATCTTTTAAATTTAGTGATGACAGG
 CTTTTGTTGGTTTTTAAACCAGCTCTATGTATGAGAATGATATATTTTTGAAAACCTTAAATTTTGAAGCC
 ATAATTTTTCTTATCTAAGAGTTGGGGGTTGGGGTGTGGAATCTGGAGAGTACAAGTTGGTCTTTGGCTT
 CTGGCAACTTACCATTCAATTTTTGGAAGCACAGCTAGCATATCAACATCCAGACGAGAGCGCTGGTCCC
 GTCCACAGAGCAGAGTGAAGCATTCTGGACTTGATGCTTAATAGCCTGGCCTGGGAGAAAAGGGTAAGGTTT
 ATTTTTGGAACCCAGATCAGTTGCATGTAAACAGATGGCAGATGGCTATTTAAATGCTGTATGATGGGG
 CCGGGCGCGGTGGCTCACGCCCTGTAATCCTAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCGGATCACTGAGGTCA
 GGAGTTCTAGACAGCCTGGCAACATGGTGAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAACCTTAGCTGGGT
 GTGGTAGTGCCTGCTGTAATCCTAGCTACTTAGGAGGCTGAGGAGGAGAAATCGCTTGAACCTGGGTGGC
 GGAGGTTGCAATGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACCTCCAGCCTGGGTGCAATGAAACTGGGAGTGAACCTC
 CGTCTCAAAAAATAAAATGCTGTATGAACAAGTGAAGCAATCTGTGAGGTGTGGGACACCTGGGCAAG
 ACGAATTCATGCTGTCTGTGAAAAGGAAGTTGCACTGTAACATATGCCATAGCTTGGCCCTTGCTTTGTA
 TGCAACCTTAGCTGATGGGAAATTTCCAAACATAAGTGGCAGGAAAGAGGCAGGCAGGAGGCAGGG
 GTCTGTGCTGTGCAAGTCACTGGTTTTTATGACTATCATTTTCATTGAATGCATTTGTTGAATGGGACA
 AAAGGAACATTTTCTAAATCAGCTTGACTCTTTATAAAAAACAGCTGAATCTT

SEQ ID NO:2 (SGP002)

GAAAAGAGACGAGGAGGAGCGACGGGACGGGACGGGAGCGGAGCCGCCCTCTCGGCTCCGGC
 GCGGCGCTCGCAAGTCCGGGAGGCGAGGGGGCCCGAGGGGAGACGCGGTGACAACCTTTCCCTTCCCTCT
 GAGGGAATTTGGAGGTCCGGCGCCCCAAAAGCTTTTCACTCCAGTGTAAAGCTGTTGGAGCGGGGAGCAAA
 GGTAAAGAAATGATGTAATGCCCTGGCTGCTCCAAAGCATCTTTGTTGTGGAATGGTTATCCAGTCACTCT
 CTTTATGAATCAAATGTGAGGGGCTGCTTTGTGGACGGAGTCCCTTGGCAAGAGCACATCAACGGGAAAGAG
 AAAGAGACATTTCACTTGGAGGGCTCTTCTGAAAATGGGTTTAACTCTCCTTTTGGCAGTCACCACCAGCC
 TGACCTCATACACTTTTGTACAAATGGAGTGGCTGAGCCTTTGAGCACACCACCATACATCATCGTGCA
 AATTAAGAAGGAGGTGGGAAAAGAGGACTTATTTGTGTCATGGCCCATGAGATGATTGGAACCTCAAATG
 TFACTGAGAGGTTGGTGGCTGCTGTTGAAAGTGGAAACGGAAAAGTGTGCTAATGATAGCCGGCCATTT
 GTGGAATACAATACATCCCACATTTTGAAGCCATTAATATCAACTGCTCCAAGCTTATGAAGCGAAGGTT
 GCAACAGGACAAAGTGTAAATACAGAGCTCATCCAGCATTCAGCGAAAACATAAGGTTGACATTTGATGCA
 GTCAGAAGGTTGTAGTTTACGATCAAAGCTCCCAAGATGTTGCCCTCTCTCTTCCAGACTGTTTTCTCACT
 GTACTTCTGGGTAACCTGGAGAAGAGCTTCAACTCTGTTTACCTGCTTGCAGGTGGGTTTGTGAGTTCTC
 TCGTTGTTTTCCCTGGCCTCTGTGAAGGAAAATCCACTCTAGTCCCTACCTGCATTTCTCAGCCTTGCTTAC
 CTGTTGCCAACATTTGGCCAAACCCGAATTTTCCCAATCTTTATCTTGGCTGCCAGCGAGATGCTCTCAAC
 AAGGAGCTGATGCAGCAGAAATGGGATTTGTTATGTGTTAAATGCCAGCAATACCTGTCCAAAGCCTGACTT
 TATCCCGAGTCTCAATTTCCCTGGCTGTGCTGTGAATGACAGCTTTTGTGAGAAAATTTGCCGTGGTTGG
 ACAATCAGTAGATTTTCAATGAGAAAGCAAAGCCTCCAAATGGATGTGTTCTAGTGCAGTGTTAGCTGGG
 ATCTCCCGCTCCGCCACCATCGCTATCGCTACATCATGAAGAGGATGGACATGTCTTTAGATGAAGCTTA
 CAGATTTGTGAAAAGAAAAGACCTACTATATCTCCAAACTTCAATTTTCTGGGCCAACTCCTGGACTATG
 AGAAGAAGATTAAGAACCAGACTGGAGCATCAGGCCAAAGAGCAAACCTCAAGCTGCTGCACCTGGAGAAG

CCAAATGAACCTGTCCCTGCTGTCTCAGAGGGTGGACAGAAAAGCGAGACGCCCTCAGTCCACCCTGTGC
CGACTCTGCTACCTCAGAGGCAGCAGGACAAAGGCCCGTGCATCCCGCCAGCGTGCCACAGCGTCCCAGCG
TGCAGCCGTCGCTGTAGAGGACAGCCCGCTGGTACAGGCGCTCAGTGGGCTGCACCTGTCCGAGACAGG
CTGGAAGACAGCAATAAGCTCAAGCGTTCCTTCTCTGGATATCAAATCAGTTTCATATTCAGCCAGCAT
GGCAGCATCCTTACATGGCTTCTCCTCATCAGAAGATGCTTTGGAATACTACAAACCTTCCACTACTCTGG
ATGGGACCAACAGCTATGCCAGTTCTCCCCTGTTGAGAACTATCGGAGCAGACTCCCAGAAACCAGTCCCT
GATAAGGAGGAAGCCAGCATCCCCAAGAAGCTGCAGACTGCCAGGCTTCAGACAGCCAGAGCAAGCGATT
GCATTCGGTCCAGAACAGCAGCAGTGGCACCAGCCAGAGTCCCTTTATCTCCACTGCATCGAAGTGGGA
GCGTGGAGGACAATTACCACACCAGCTTCCTTTTCGGCCTTTCCACCAGCCAGCAGCACCCTCAGCAAGTCT
ECTGGCTGGGCTTAAGGGCTGGCACTCGGATATCTTGGCCCCCAGACCTTACCCTTCCCTGACCAG
CAGCTGGTATTTTGCCACAGAGTCCCTCACACTTCTACTCTGCCTCAGCCATCTACGGAGGCAGTGCCAGTT
ACTCTGCCTACAGCTGCAGCCAGCTGCCACTTGGCGAGACCAAGTCTATTCTGTGCGCAGGCGGCAGAG
CCAAGTGACAGAGCTGACTCGCGGGCAGCTGGCATGAAGAGAGCCCTTTGAAAAGCAGTTTAAACGCAG
AAGCTGCCAAATGGAATTTGGAGAGAGCATCATGTGAGAGAACAGGTCACGGGAAGAGCTGGGGAAAGTGG
GCAGTCAGTCTAGCTTTTCGGGCAGCATGGAAATCATTGAGGTCTCCTGAGAAGAAAGACACTTGTGACTT
CTATAGACAATTTTTTTTTTCTTGTTCACAAAAAATTCCTGTAAATCTGAAATATATATATGTACTACA
TATATATTTTTGGAAAATGGAGCTATGGTGTAAAGCAACAGGTGGATCAACCCAGTTGTACTCTCTTAA
CATCTGCATTTGAGAGATCAGCTAATACTTCTCT

SEQ ID NO:3 (SGP001)

GGGGGAAAAGTTAAGAAAAGCCCCGAGAGCGGGGTGAAGGGAGTAACTGGTCTAGCCCAGTTCTGT
CTGCGCCAGTCCAGAGGGTTTGAACCTCCCGGAGCCCTTCCCAATAGAAAAGCTGTTTTCCTCAGGATT
TTCATCTCAGCTGCTTTTTTTAAGGTGGTTAAGCTGTGCGCGCCACCTCATAAAATGGTTGTCTCT
CAGGAGTGAAGACTCCAGCGGCCCGCCCTGGGACCCCTCACCAGGCTGGCTCCCTTCGGCCCCCTCC
CCACCCCACTCCACAGCACCCAGTGTGGCAACCGCGGATTCAGCACGAAGGAGGAACCCAGAGGG
TGCGGCGGCCGAGGCGCACGCACTCGGCCAGCTTCGGCAACTCAAGGGTTACGACCAGGCGGCGCG
CGCCAGGGGAGAGCGGTAGCTGACAGGTGGCGCTGCGCACTGGGAGCGCTCATTGTGCCCGCAGCTG
CCGAACCGCCCGCCCGCGCCGTTCCGGAGCGTCAGTCCGGCAGCTCTGGTGGTGGTGGGAGTCTGCG
GCCGTTCCCGCGCCCTCCTCCTCCTCCCGTTCCCTCACCCACCCCGCACCCCTTTCCCACTCCCGG
TCCGTACCCCTCCCGTCCCCACACTCAGGACAGAATGCCCTGCCCGGAACACCCAGCAGCGCTAGAT
GGCTTTGGTCCAGGTCAGGGTCCCTACCCAGCACCCTCCAGCCCTGCGCTCGGAGGCAGACA
GTGGGAGGAAGAATGCCGCTCAGAGCCAGGAGCATCAGCGAGAGCTTCTAACTGTCAAAGGTGTGCC
CTTTTCTACACGGGGAAATGGCTCATCCACCAAGAATCAGCCACAGACGGAACAAGCATGCAGGCGA
TCTCCAACAGCATCTCCAAGCAATGTTTCACTTCCGCCCAGAAGACAATCAGGCTGGCTGTAAGC
TGAAAGTACTTACCAGAATCGAACAGCTATATGGTAGTGGTTTCAACTAATGGTAGACACAGACTGAA
GAAAGCATCGTCTAGGAATGGATTTCTCCTTAATGACAGTAGCACTTGTACCATGGGCTTAGTTTTGCC
TCTCTGGAGCGACAGCTAATTCATTTGGATGGTGTATGGTGGGTTGAGTGTATCGACGGATAACAGAGTTC
ACATATCAAACCTGTATCTGTGCAGGCAATGTGGTCTGCACTACAGAGCTTACACAAGGCTTGTGAAGTC
GCCAGAGCGCATAACTACTACCCAGGCAGCCTATTTCTCACTTGGGTGAGTTATTATGAGAGCCATATCAA
CTCAGATCAATCCTCAGTCAATGAATGGAATGCAATGCAAGATGTACAGTCCACCCGCGACTCTCCAG
CTCTCTTCCAGACATACTACTGAACGTGAACGAACAGAAAGGCTAATTAACCAAAATTAAGGGAGATC
ATGATGCAGAGGATTTGGAGAATATACATCCAAAGAGATAAGAACAGAGTTGGAAATGCAAATGGTGTG
CAACTTGGGGAAATCAAGGAATTTATAGACAAATGAAATGATAGTATCCTTGGTCAAATGGATAGCCCTA
CACAGATATTTGAGCATGTGTTCTTGGGCTCAGAATGGAATGCCCTCAACTTAGAGGACTTACAGAACC
GGGTACGGTATATCTTGAATGTCACTCGAGAGATAGATAACTTCTTCCAGGAGTCTTTGAGTATCATAA
CATTCCGGTATATGATGAAGAGGCAACGGATCTCCTGGGCTACTGGAATGACACTTACAAATTCATCTCTA
AAGCAAAGAAACATGGATCAAATGCCCTGTGCACTGCAAAATGGGGGTGAGTCGCTCAGCCTCCACCGTG
ATTGCTATGCAATGAAGGAATATGACCGAGCCTATGACTATGTGAAGAAAGCAGAACGGTAACCAAGCC
CAACCAAGCTTCATGAGACAACCTGGAAGAGTATCAGGGGATCTTGTGCAAGCTTCCTAGGCTTGATTC
ATGGAGGGAGGACAAGCCCTGGGGAGAGAAAAGCACAGAAATTTGAGTCAGTAGATCTGGTTTCCATTCCT
GGTTCACCCCTTGTGCTGCAACCCGTGAGAAGTTACTTCACTTTCTCATCCTTACCTGACCCCATCTATAAA
ATGAAAATCAAGAGATCCATCTCACAGGGTTATTGTGAATAAAAATGTGTTTGAATGTT

SEQ ID NO:4 (SGP018)

GAAGAAGCCCTGAGGAAGGAGGTGGCTGGTCTCTCACTGGCCGGAGCTTCAGCTTCAGTCATTTTCAT
CTGGTCCCTCAGCCCTTGGTGGGGAACATCCAGGCAGGTAGAGGTGAGTGTGCTTCTCCCTTGTCAAT
CCTGGTGAGCCAGGACTTACAATACAAGGGGCAGCGCTTGGCCCTGAGTGTGAGGGCACAACCATGATG

GCTGGGACCAGCTGCTGGTATCCTTCATGTCTTTAATAGGCTCCAGGATGACGCCTGAGCCAAAGGCCCT
ACCTCCTGTGGCCTTGGTTAGAGACACCGAAGGCCAGCTGTGTCTTCCCAGCAGAGACAAAGAGGTTGGC
AGGTTGTCTATGGCGACCAGAAAGSACACAGAGGAGGAGCAGGTTAGTCCCAGCGAGGAGGACGAAGCCAAC
GTGAGGGCGGTGACAGCCACTACCTCCGAAGCCCTCCCCTAGCCAGTATTCGATGGTCTCAGATGCAGA
AACAGAAAGCATTTTTCATGGAACCCATTACCTCTCCTCAGCCATTGCAGCCAAACAGATCATCAATGAAG
AACTCAAGCCACCGGGGTCAGAGCAGACCGCAGAGTGTCCAGGCATGCTGGAGTCTGCTGAACAGCTGCTG
GTGGAGGACCTGTACAAACCGCTCAGGGAGAAGATGGATGACACCAGCCCTCTATAATACGCCCTGTGTCTT
GGACCTACAGCGGGCCCTGGTTCAGGATCGCCAAGAGGCGCCCTGGAATGAGGTGGATGAGGTCTGGCCCA
ATGTCTTCATAGCTGAGAAGAGTGTGGCTGTGAACAAGGGGAGGCTGAAGAGGCTGGGAATCACCCACATT
CTGAATGCTGCGCATGGCACCGCGTTTTACACTGGCCCCGAATTCTACACTGGCCTGGAGATCCAGTACCT
GGGTGTAGAGGTGGATGACTTTCTGAGGTGGACATTTCCAGCATTTCCGGAAGGCGTACTGTCAATTACA
TCATTTTCTCTTGTGTTTTCAATTCAGGGAAAGTCCCTGGTTCAGCAGCGAATGGGCATCAGCCGGTCAGCA
GTGCTGGTGGTCCCTACCTGATGATCTTCCACAACATGGCCATCCTGGAGGCTTTGATGACCGTGCCTAA
GAAGCGGGCATCTACCCCAATGACGGCTTCTGAAGCAGCTGCGGGAGCTCAATGAGAAGTTGATGGAGG
AGAGAGAAGAGGACTATGGCCGGGAGGGGGATCAGCTGAGGCTGAGGAGGGCGAGGCACTGGGAGCATG
CTGGGGCCAGAGTGCACGCCCTGACGGTGAAGAGGAGGACGACAGCGCCAGCCACCTGAGTGGCTCCTC
CCTGGGGAAAGGCCACCCAGGCCCTCAAGCCCTCACCTCATAGACGAGGAGGAGGAGGAGAACTGTACG
AGCAGTGAAGAAGGGGCGGGCTCCTCTCAGACAAGGTCCCCAGGATGGAGTGGCTGGCGCTCAGCC
TCTCTGGCCAGGCTGGGAGGAGCTCGAGCACGAGGACGCTGGAGAGGATCATCCAGGATGGCAGAGCCG
AAACGAGAGGTACCAAGCAGAAGGGTACCGAGGTGGGAAGGGAGGAGGAGAAGGAGGAGGAGAGCGACG
CTGGCTCCTCGGTGGGAGGCGGGCGCCACCCTGAGCGAGAGCAGCGCTGGGAGAGCGTGCAGGCCAC
GACATCTGGGTCTGAAGCAGCAGCTGGAGCTGAACCGCCCGGACCACGGCAGGAGGCGCCCGCAGACTC
GATGTCTCGGAGAGCACCTGGGACCGATGGAACGAGAGGCTGCTGGAGATTGAGAAGGAGGCTTCCCGGA
GGTACCACGCCAAGAGCAAGAGAGAGGAGGAGCGCGCAGACAGGAGCTCAGAAGCAGGAGCAGGTTGCGGG
GATGATGAGGACAGCGTGGGCTCTGAGGCCAGTTCCTTCTACAACCTTCTGCAGCAGGAACAAGGACAAGCT
CACTGCCCTGGAAAGATGGAAGATCAAGAGAAATCCAATTTGGATTTCACAGAAAGACTTTGGAGCGGGAG
ACAGCAGCGGTGAGCCCGGTGCAGAGGAGGAGTAGGGGAGAAGAACCCTCCGACCTCAGCCGTGACAGCC
TACCAGGCTGGAAGCTGAAACACCAGAAGAGGTGGCAGTGAACAAGGAGGAGGTTGGTGGAGCTCAG
CAAGGGGGGAGACTCGCCCTTGGCTAAGAAGAGACAACCGGAGGCTGAGAGCTGCTGGAGAGAAGCCGGCAG
CGCTGGAGGAGAGCCAGTCTATGGCAAGCTGGGAGGCGGACAGCTCCACGGCCAGCGGGAGCATTTCCCTG
TCTGGCTTCTGGTCTGCAGACCCCTCAGTCAAGCGCTGATGGGGACACAGCTCAGTACTGAGCACCCAGAG
CCACCGCTCCCACCTGTCTCAGGCTGCAAGCAACATAGCGGGGTGTTCAACCTCCAACCCACCACACCC
TGCTTCAACCTGAGTGGGCTGGAGACACCATTTCCATGCCAGTATCCAGACTGGATTGCCAATGTA
GTCAAGTGAACCCCTTGTCTCAGAAGCAAAATGAAATGCTGCTGTGTGCCGCTCACCGTCTGTTGCAAGCAT
GAAGGCAGTACCAGCGGTAGCTGCCCTGGGGATGACCAAGTCTCCATGCTTAGTGGACACAGCAGCTCCT
CCTTGGGTGGCTGCCTGTGCCTCAGAGCCAGGCAAGACCAGCTCTGACATGCAGTCTGTGTCTGTCTGC
AACACCACACTGAGCTCACCCCGGAAAGTTGCAGAAGCAAAGTGAGGGGGACCAGCAAGCCCATCTTTCAG
CCTCTTGTCTGACAATGTGGACCTAAAGGAAGTTGGCCGGAAGGAGAAGGAGATGCAGATGGAGCTTAGGG
AGAAGATGTCTGAGTACCAATGGAAAAGCTGGCCTCAGACAACAACCGCAGCTCCCTCTTCAAGAAGAAG
AAGGTCAAGGAAGATGAGGATGATGGTGTGGGTGATGGGGATGAGGACACTGACAGTGCATAGGGAGCTT
CCGATATTCTCCCGCAGTAATTTCCAGAAACCTGAAACAGACACATGCTCCTCCCTGGCTGTCTGTGATC
ACTATGCAAGTGGCAGCAGAGTTGGCAAAGAGATGGATAGCAGTATTAATAAGTGGCTCAGTGGCCTCAGG
ACGGAGGAAAAACCTCCTTTCCAAAGTACTGGTCTGGAAGTCCAGAGGGGAAGTACACCAGATCGTCCCT
GCTCAGGGAGACAGAGTCTAAATCCTCCAGTTACAAGTTTTCCAAATCCCAGTCCAGGAAACAGGTACACC
TCCTCCTACCACGAGGCAAATGGCAACTCTGTAAGAAGCACTTACGGTTCTCATCTTCTCCACCAGGGA
GGCAGAGAGATGCACAAGTTCTCCAGGTCCACGTACAACGAGACCTCAAGTTCCCGAGAGGAGAGCCAG
AGCCCTACTTCTTCCGCGGACCCAGAGTCTCAGAAAGGGAAGAGTCCCAGAACCAACAGCGCCCAAT
TGGCCAGGTCCAGGGACTGGGAAGATGTGAAGAGTCAATCCAAGTCAAGCTTCTCTGAATTTGGAGCCAA
GAGGAAGTTCACCCAGAGCTTTATGAGGTCTGAAGAAGAGGGAGAGAAAGAGAGGACAGAAAACAGAGAAG
AAGGGAGGTTGCATCTGGACGGCGGTCCAGTATCGGAGAAGCAATGACAGGGAGGAGAGGAAGAAATG
GACGATGAAGCCATCATTTGCTGCTGGAGACGCGCGCAAGAAGAAACCAGGACCAAGCTGCAGAAAAGGAG
GGAGGACTGAGCTGGGAAAATCTGAGAACACTGAAAGAAACCCTCACGTTAGCATAGGGCTCAGGGCAC
ACGTTGCCACCACTCATCGCAGGATGAGGATACAGAGAGGATCTTCCAGAGGGGCAGAGCCAAAATGAGAG
GTACCAAGCATAAGGGCAGCAGAGGTGGAGTAGGGAGGAGGCAAGGAGGGGGAGAACCATCAATACGAATA
CGAGGTCCGAATGCTGGACCAACTGATACCATTTTCTGTTGCTCAGCGCCCTTAAGCTTTGGTGTTCAC
TTAATGTATTTGACAGTGTTCATCACAGGCTAGAGAGGTGAGCTTGGAAAAGCACTGTAGTTTGTGAGAGA
CTCCAGTTTACATCCAGAAAGGCCATGAACATAGGACACGCTTCTGTCTGTAGAGGCTTCATATGAGACCC

AGAAAGTCTATCCTATGGCAAGTCTGACCTCTCCTGGCAATGCTCAGTTCGATTTTTTTTTTTAATGTT
TTGAGTCTCCATTAATAATGGTATGTTGG

SEQ ID NO:5 (SGP003)

GTC AAGGTTTCAGGTCGC ACTGGAAAATCATTTTGCAAGCAGATGTCATAGGTCTCCTCTTAGACTGGAC
GGCAGCGAAGGTCAGCGTCACAGATCTGACCCTAAAAATAGGCCCTCTGTTGCCAGTCGGGGTGGCTGGGCG
TGCGGCTGCTACATGCCCCACGGACCAGAACCTCCCGACGCGGCCAGGCCCGGCACCCAGCTGCAGAA
AGGAGAGAAAATCCCTTGCTCTAAAATGACATCTGGAGAAGTGAAGACAAGCCTCAGAATGCCTACTCA
TCTGCCAAGAGGCTGTCGCCGAAGATGGAGGAGGAAGGGGAGGAGGACTACTGCACCCCTGGAGCCTT
TGAGCTGGAGCGGCTCTCTGGAAGGGCAGTCCCCAGTACACCCACGTCACAGAGGCTGGCCCAAGCTCT
ACATTTGGCGATGAGGGGACGGCGCTGGACCCTATAGGCTGCAGAGGGCGGGGTTACGCGACGTCGTGAAC
GCGGCCACGCGCGCTGGAACGTCGACACTGGGCCCGACTACTACCGCGACATGGACATCCAGTACCACGG
CGTGGAGGCCGACGACCTGCCACCTTCGACCTCAGTGTCTTCTTCTACCGGGCGGAGCCTTCATCGACA
GAGCGCTAAGCGACGACCACAGTAAGATCCTGGTTCACTGCGTCATGGGCCGAGCGGTCAGCCACCCCTG
GTCTGGCCCTACCTGATGATCCACAAGGACATGACCCTGGTGGAGCCATCCAGCAAGTGGCCAAAGAACC
CTGGCTCCTCCGAAACGGGGCTTTTGAAGCAGCTCCGGGAGCTGGACAAGCAGCTGGTGCAGCAGAGGC
GAGCGTCCCAGCGCCAGGACGGTGGAGGAGGATGGCAGGGAGCTGTAGGCCCGACTCACAGGGCCAGCA
GAGGCACTTGGGGACAGAGGGGAGAGGCAGAACATAGCCCTGGCTAGGACTCCAGAGAAGGGATGGTGAA
ACCGAAGCTCGACTCTTCCAAACCATCTTGTTCACACTCCCATGTGTGCTGGGGACAGGGAGGCCAGCA
GCTGCCCGGGGACAGGCTGAGCGCTCAGCCTCTCAGCAAAATGGGAGGGACGGGCTCCCCGGCTCTGGGT
CACAGAGGAGCATGCCAGCTGCACCAAGTCTCTGCTTTGGTTTTGTTTTTTGGTGAGAGGAAGAGGG
AAAAGATTTTAAAATGTGGGGCTTTATTTTGTAAATATCCTTCGGGCTTTGTTT

SEQ ID NO:6 (SGP014)

ACAGAGGCAGAGGGGTGGCGGGCTGGCCCATGGCTGAGACCTCTCTCCAGAGCTGGGGGGAGAGGACAA
AGCCACGCCCTTGCCCCAGCATCCTGGAGCTGGAGGAGCTCCTGCGGGCAGGGAAGTCTTCTTGACGCCGTG
TGGACGAAGTTTGGCCCAACCTTTTCATAGGAGATGCGGCCACGGCAACAACCGCTTTGAGCTGTGGAAG
CTGGGCATCACCCACGTGCTGAACGCCGCCACAAGGGCCTCTACTGTGTCAGGGCGGCCCTGACTTCTACGG
CAGCGTGTGAGCTACCTGGGGGTGCCAGCCACGACCTCCCTGATTTTGACATCAGTGCCTACTTCTCCT
CTGCGGCTGACTTCATCCACCGTGCCCTCAACACGCCCTGGGGCCAAAGGTCTGGTGCCTGTGTGGTGGGC
GTGAGCCGCTCTGCCAGCTGGTCTGGCTTACCTCATGCTGCACAGCGGCTGTCCCTGCGCCAGGCGGT
GATCACCGTGGAGCAGCACCGATGGGTCTTCCCAACCGAGGCTTCTGACCCAGCTTGCAGGCTGGACC
ACTGGTCTTACTCCCTGCCATGGGGCTCTGCCACTTTGCCACCCTGGCACTGATCCTGCTGGTGTGCTGCT
AGGGCTCTGGCCAGGCGGACACACAGAAGATGGTGGAAAGCCAGCGTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGT
CTCCATCTGGCTCCTCCTGGGCCCTACACCCCTCTCAGCCACTGTCTTCAGTCTCCACAGAAACAGCATC
AAGTGTGCGGAGACAGGCGGCTGAAAGCCAGCAGCAGCAACTGCCCGTCAGAGAAGTGCACAGCTGGGCC
AGATACTCCACAGGTGGGCCATATTTCTGGTGGCGCTGAAAATCCAGCTCCGACGGGTCCCTGACTCCTT
CAGCCAGCAGATGCCTGAAACAAGCTACCTGACCCGGGTGGGGCTGACATCCAGTGTGGCCTGAGTCTGT
GGGGATGACTCACTGAGAAGCAGGACCTCCGGAGGCCAAGATCCATGGGGCAGTCCAGGCATCTCCC
TACCAGCCGCCACATTTGGCTTCGCTGCAGCGCTTGTGTGGGTCCGTCAGGCTGCCACACTGAACCATAT
CGATGAGGCTTGGCCAGCCTCTTCTGGGAGATGCGTACGCGAGCCCGGACAAGAGCAAGCTGATCCAGC
TGGGAATCACCCACGTTGTGAATGCCGCTGCAGGCAAGTCCAGGTGGACACAGGTGCCAAATTTCTACCGT
GGAATGTCCCTGGAGTACTATGGCATCGAGGCGGACGACAACCCTTCTTCGACCTCAGTGTCTACTTTCT
GCCTGTGCTCGATAACATCCGAGCTGCCCTCAGTGTTCCTCAAGAGGATGGCCATGGGTGTCTCTTCTTCC
CAAAGGGGTGGGTGGTTCAAGGGCAGGTAGCTGATGCTAAGTTGGTTCTCCCTACAGGCCGCTGCTGGTA
CACTGTGCCATGGGGTAAAGCCGCTCTGCCACACTTGTCTGGCTTCTCATGATCTGTGAGAACATGAC
GCTGGTAGAGGCCATCCAGACGGTGCAGGCCACCCCAATATCTGCCCTAACTCAGGCTTCTCCGGCAGC
TCCAGGTTCTGGACAACCGACTGGGGCGGAGACGGGGCGGTTCTGATCTGGCAGGCAGCCAGGATCCCTG
ACCCTTGGCCCAACCCACAGCCTGGCCCTGGGAACAGCAGGCTCTGCTGTCTTAGTGTACCTGAGATG
TAAACAGCAAGTGGGGCTGAGGCAGAGGCAGGGATAGCTGGGTGGTGCCTCTTAGCGGTTGGATTTCC
TGACCAATTCAGAGATCTTTATGCAAAAGTGAGTTCAGTCCATCTCTATAATAAATAATTCATCGTCAT

SEQ ID NO:7 (SGP060)

ATGTGCCCTGGTAACTGGCTTTGGGCTTCTATGACTTTTATGGCCCGCTTCTCCCGGAGTAGCTCAAGGTC
TCCTGTTCGAACTCGAGGGACCTGGAGGAGATGCCAACCGTTCAACATCCTTTCTCAATGTCTTCGAGT
TGGAGCGGCTCCTCTACACAGGCAAGACAGCCTGTAACCATGCCGACGAGGCTTGGCCAGGCTCTATCTC
GGAGACCAGGACATGGCTAACACCGCCGGGAGCTTCGCCCTGGGCATCAGGCACGTCCTCAATGCCTC

ACACAGCCGGTGGCGAGGCACGCCGAGGCCATGAGGGGCTGGGCATCCGCTACCTGGGTGTTGAGGCC
 ACGACTCGCCAGCCTTTGACATGAGCATCCACTTCCAGACGGGTGCCACTTCATCCACCGGGCGCTGAGC
 CAGCCAGGAGGAAGATCCTGGTGCATTTGCTGTGGCGGTGAGCCGATCCGCCACCCTGGTACTGGCCTA
 CCTCATGCTGTACCACCACCTTACCCTCGTGGAGGCCATCAAGAAAGTCAAAGACCACCGAGGCATCATCC
 CCAACCGGGGCTTCTGAGGCAGCTCCTGGCCCTGGACCGAGGCTGCGGCAGGGTCTGGAGGCATGA

SEQ ID NO:8 (SGP008)

ATGCAGGGGACAGACTGTAGTTCCAAAAGATTCTTACACTATATCCCTTATCCAGAGGCTGCGGGGCGGTGA
 GGCCGCAAGGAGAACCATGAGAACCTTCTCGGCTGTCTGCCCTAGTGAGATCCCCACAGACAGCTAGCA
 TCGACTGCCACACGTGGTCAGTTTCTAGTGAACCAATACTTCGCTGCAGGGGTGCGGGCCTGGGCCCTCAG
 GGCAGCTGTGACCGGATCGCTTCCCGGGCGGCGAGCTGGGGGTGCACCCGGACCCGCCCCCGGGATCAT
 GGGCAATGGCATGACCAAGGTACTTCCCTGGACTCTACCTCGGAACTTTCATTGATGCCAAAGACCTGGATC
 AGCTGGGCGGAAATAAGATCACACACATCATCTCTATCCATGAGTCACCCAGCCTCTGCTGCAGGATATC
 ACCTACCTTCGCATCCCGGTGCTGATACCCCTGAGGTACCCATCAAAAAGCACTTCAAAGAATGTATCAA
 CTTCATCCACTGCTGCCCTTAATGGGGGAACTGCCTTGTGCACTGCTTTCAGGCATCTCTCGCAGCA
 CCACGATTTGACAGCGTATGTGATGACTGTGACGGGGCTAGGCTGGCGGGACGTGCTTGAAGCCATCAAG
 GCCACCAGGCCATCGCAACCCCAACCCAGGCTTTAGGCAGCAGCTTGAAGAGTTTGGCTGGGCCAGTTC
 CCAGAAGCTTCGCCCGCAGCTGGAGGAGCGCTTCGGCGAGAGCCCTTCGGCGACGAGGAGAGTTGCGCG
 CGCTGCTGCCGCTGTGCAAGCGCTGCCGGCAGGGCTCCGCGACCTCGGCCTCCTCCCGGGGCGCATCA
 GCAGCCTCCGAGGGAAACGTCAGCGCCTGGTCCCGCGCACGCCCGGGAAGCCACCGGCCCTGCCGCT
 GCTGGCGCGCGTCAAGCAGACTTCTCTTGCCTCCCGCGGTGTCTGTCCCGCAAGGCGGCAAGTGAGGAT
 GCAGTCCAGCCGTGGCTCCCACTTCCGACTGGCTCCCTTCGGGGGTGTCTGCGCCTTCCACGCCCCCA
 GGACGGGGCCAGAGGCTGGGGGAGCCCGCGGCGGCTGAACCTGCTTCCCGCGCCCGCTGCTGCTCC
 GCGTCTGCAGTCAGCGTCCCAACCTGTGCTCTCTGTGTCCGGGCGGCGCTGCTGCAGCCACCTGTGCT
 TTAGTCCCTGGGCTGGGGAGGGGGCCACCCTTAAAGCGCGGGGAGGGAGGGAGAGTGAGGGT
 TTGACGGGCTGGAGGTTAATAAGAGACACAGAAGAGCTGCCTGT

SEQ ID NO:9 (SGP039)

ATGATAGAGGATACAATGACTTTGCTGTCTCTGCTGGGTGCGATCATGCGCTACTTCTTCTGAGACCCGA
 GACGCTTTTCTGCTGTGCATCAGCTTGGCTCTATGGAGTTACTTCTTCCACACCGACGAGGTGAAGACCA
 TCGTGAAGTCCAGCCGGGACGCGCTGAAGATGGTGAAGAGCAAGGTAGCCGAGACCATGCAGAACGATCGA
 CTCGGGGGGCTTGATGTCTCGAGGCCGAGTTTCCAAAGACCTGGGAGTTCAAGAACCACAACGTGGCGGT
 GTACTCCATCCAGGGCCGAGAGACCACATGGAGGACCGCTTCGAAGTCTCACGGATCTGGCCAACAAGA
 CGCACCCCTCCATCTTCGGGATCTTCGACGGGCACGGGGAGAGACTGCAGCTGAATATGTAATAATCTCGA
 CTCCCAGAGGCTCTTAAACAGCATCTTCAGGACTACGAGAAAGACAAAGAAAATAGTGTATATCTTACCA
 GACCATCCTTGAACAGCAGATTTTGTCAATPGACCAGAAAATGCTAGAAAATGACTGTATCTTATGATG
 AAGCAGGCACAAGCTTTGATGTCTGCTATCAGATAAAGACCTCACGTGGCCAACGTGGGTGACTCG
 CGCGGGGCTCTGTGTGACAAAGATGGGAACGCTATTCCTTTGTCTCATGATCACAAAGCCTTACCAGTTGA
 GGAAAGAAAGAGGATAAAGAGAGCAGGTGGTTTTCATCAGTTTCAATGGCTCCTGGAGGGTCCAGGGATCC
 TGGCCATGCTCGGTCCCTGGGGGATTAATCCGCTGAAAAATCTCAACGTGGTTCATCCAGACCCAGACATC
 CTGACCTTTGACCTGGACAAGCTTCAGCCTGAGTTCATGATCTTGGCATCAGATGGTCTCTGGGATGCTTT
 CAGCAATGAAGAAGCAGTTTCGATTCATCAAGGAGCGCTTGGATGAACCTCACTTTGGGGCCAAGAGCATAG
 TTTTACAGTCATTTTACAGAGGCTGCCCTGACAATATAACAGTTCATGGTGGTGAAGTTCAAGAAATAGCAG
 AAAACAGAAGAGCAGTGA

SEQ ID NO:10 (SGP040)

ATGTTGTCCGCTCCGTGTTGTGATGACAGGAGAATGTGTGTGTCCCGGGCCAGACGAATTGGAATCCC
 AGTCAGAAGTTCAGCCTGCCACTGTCTCTGATGCCATGCCAGCACCACCACTCAACTGTTTTTCTCTCA
 TCCGTAACGTGAACAGCAGGATCTATGGCACTGCATGTTACTGCCACCACAACATCTCTGTTGTCC
 TCATCGTACATTCCTCAGAGTCGACTGAGATACACACTCATCCAGCATATGCTACCTTTTGCAGGCCAAA
 GGAGAAGTGGTGGCAGTACACCAAGGAAGGAGATATGCTTCCACACCACAGAAATTTACCTCACACCTC
 CACAAGTCAATAGCATCCTTAAAGCTAATGAATACAGTTTCAAAGTGCCAGAAATTTGACGGCAAAATGTCA
 GTTCTATCCTTGGATTTGACAGCAATCAAGCTGCCATGCAAAATGCACCCATGAGGACCGGAGAGTGCAGC
 AACCTGCTTGCAGACCAGAGGGATGCTTTGGGGGTTTTGATGGCCATGCAGGTTGTGCTTGGTCCCAGG
 CAGTCAGTGAAGACTCTTTTATATATGCTGGCTCTTGGTACCCCATGAGACTTTGCTAGAGATTGAA
 AATGCAGTGGAGACGCGCCGGGCACTGCTACCCATTTCTCAGTGGCACAGCACCCTAATGATTTACTTTAG
 TAAGGAGCATCCAAATTTGACTTTAACAGCTTGGAGACTTACTGGCAAGAGCTTATAGACCTCAACACTG

GTGAGTCGACTGATATFGATGTTAAGGAGGCTCTAATTAATGCCTTCAAGAGGCTTGATAATGACATCTCC
 TTGGAGGCGCAAGTTGGTGATCCTAATCTTTTCTCAACTACCTGGTGCTTCGAGTGGCATTFTCTGGAGC
 CACTGCTTGTGTGGCCCATGTGGATGGTGTGACCTTCATGTGGCCAATACTGGCGATAGCAGAGCCATGC
 TGGGTGTGCAGGAAGAGGACGGCTCATGGTCAGCAGTCACGCTGTCTAATGACCACAATGCTCAAAATGAA
 AGAGAACTAGAACGGCTGAAATGGAACATCCAAAGAGTGAGGCCAAGAGTGTGCGTAAACAGGATCGGCT
 GCTTGGCTTGTGATGCCATTTAGGGCATTGGAGATGTAAAGTTCAAATGGAGCATGACCTTCAAAAGA
 GAGTGATAGAATCTGGCCAGACCAGTTGAATGACAATGAATATACCAAGTTTATTCCTCCTAATTATCAC
 ACACCTCCTTATCTCAGTGTGAGCCAGGTAACCTACCACGATTAAGGCCACAGGATAAGTTTCTGGT
 GTTGGCTACTGATGGGTGTGGGAGACTATGCATAGGCAGGATGTGGTTAGGATTGTGGGTGACTACCTAA
 CTGGCATGCATCACCAACAGCCAAATAGCTGTGGTGGCTACAAGGTGACTCTGGGACAGATGCATGGCCTT
 TTAACAGAAAGGAGAACCAAAATGTCTCGTATTTGAGGATCAGAACGAGCAACCCATCTCATTGCGCA
 CGCTGTGGGCAACAACGAGTTGGGACTGTGATCATGAGCGCCTCTCTAAAATGCTTAGTCTTCTGAAAG
 AGCTTGTGCGAATGTACAGAGATGACATTACAATCATGTAGTTCAGTTCAATTTCTCATGTTGTAGGGCG
 TATCAAAACCAAGAAAAGTGA

SEQ ID NO:11 (SGP012)

ATGAGGCTCCCAATCCTGTTCCGCTGCCCTGCTCTGGTTCCGGGGTTTCTTGGCAGAGGAGGAAGCATGCCCT
 CTCCCTGGAAGGGAGTCCAGGCAGGGAGAGTGCAGGCCACCCGTGAACGTGAACATCACCAGCCAGGGGA
 GACCTACTAGCCTCTTTCTGAGCTGGGCAGCCCCGGGGCCAGGCAGGTTCAACCATGCCCTCCGCTCACA
 TGTCTGAGCCCCCTCAGCTCTCCTGAAGGSCAGCAGCTCCAGGCCACACCAATGCATCCAGCTTTAAGTT
 CCAAGATCTGGTGTGAGGGGGTCCGCTACCAGCTGGAGTGAAGTGCCTTCCGACCCCTGTGGGCGAATGTCA
 CCATCACCTCACTGCTCGACTGCCCGTCAACTGTCCATGGACTGCAGCTCCACTCTGGGAGCCCATCA
 AGCCTGGAGGCCCTCATGGGGTGTGCCCCGGGAAGCAGGATGGCTACTGCTTCTCCTCTACCACCTAGA
 ATCCCAGACATTGGCACATAATATCTCCATGCCCTGGGCACCCCTGTCTACAATTTTGGCAACCTCTTGC
 CAGGTATTGAGTATATTTTGAAGTTAACACCTGGGCTGGCAACCTCCAAGCAACACCAGCCTCCATCAG
 TGGACAGCCCTGTGTCTCCAGATCACCTGGTCTGTGCATACCTGGGCACCCAGTGCCTTGCACGCCCTCTG
 GAACGGCTCCAAGGGGGCTGCCCTGGCTCCACTTGGTGTCTCACAGACCTAoctGGTGGCACCAATCTGACTG
 CAGTATTCAGACGGGGAGTCTCCATCACACCTCCCTTACCCTGTCTCAGGGCCCCCTATGAGCTGAGC
 CTCAGTGTGCTGCCAGGCCCATCGGGCAGTGGGGCCCAATGCCACAGAGTGGACCxxGATTCCGCAGC
 CAAGTCCAGACAAGGCAGTGGTGCCAAGCGGCAGCTGGATGGGCTGGAGGCTCCAAGGAGCCCGGGAGAC
 GGGCCCTGCTCTACACAGAGGGAAACCGGGCCCTCTTGGAAACATCTCTGTGCCACCTGGTGGCACCAC
 ATCACCTTCTATGGGCCAGTCCCTGGGGCCCGCTACTGTGTGGACATTGCTCATCTCTGGGAATCATCAC
 TTACAGCCCTCATGGGCCACAAGAGTCCCTGGCACCACAGTCCCTGGAGGTATCAGCAGGGGTGGCCCT
 CTGACCTGGCCATTGTCTGGGCCCCAGCACAGGACAGCGGGAAGGCTACAGGGTCTGCTTGGCACCAGGAG
 GGCAGCCAGAGGTACCAGGGCAGTGTCTTGTGATTGGGCCCGGACAATCCAGCCTGACTCTGAGGAGTCT
 GGTGCCCGGCTCCTCTATGCCATGTGAGTGTGGGCTGGGCAGAGAACCTTGGCTTAGCATCCAGAAGA
 TCCACCCCTGTACTxxCCGCTTGGCCCTCTCTGGTAAATGTGACGAGTGAAGSTCCACCCAGCTCTGG
 GCATCCTGGGTCCATGCCCCAGGGCCGAGACAGCTACCCGTTGACCCCTGTACCCGGCAGGCACCCAGGC
 CGTCGGAGCCAAGGTGGCCAGCACAGCTTTTCAAGTCTGACTCCAGGCACGAAGTACAAGGTGGAGGTTG
 TCACGCAGGCTGGGCCCCACCACATTCAGCAGCCAACACCTCTGGCTGGACCCATGAGGCATGGGGGGAA
 GGCAGCGATGCAGGAAAAGCCCTGCACACACCCAGTGTGAGTGGTGTCCATGCATGCCAGCACCCGCTGTGGT
 CAACCTGGCCTGGGCCAGCAGCCCTTGGGGCAGGGGATGTGCTACACCCAACTCTCAGAGGGCGGGCACC
 TCTCCTGGGAGCACCCCTCTGGTGCCAGGCCAAGCCACCTCATCCTGAGGGCCCTCACACCTGGATGCAAC
 CTCTCCTGTGAGTGTGTGCCAGGCAGGCCGCTGCAGGCGTCCACTCAGCGCTGGTACTGCTTGTGTA
 GCCTGGCCCTGTGGAAGATGTGCAGTGCAGCCTGAGGCCACCTTCTGGCCCTGAACTGGACAGTGGCCG
 CCAGGGATGTGGGCACCTGTCTGGTGGTGGCAGAGCAGCTGGTGGCAGGAGGGAATGCTCACCTTGTGTT
 CAGGCCGACACCTCCAAAATGCAGTCTCTGTGCCAACCTGGTGCCTGTCACTTCTATCACCTCAGCCT
 CGCCGTGCTGGGCAGGAACGGTCTGTGGAGTGGGTGGTCACTCTGGCATGTTCCACATCTGCCGAGGCCCT
 GGCATCCCCAGCGTTAGCCCCGGCCCTGAGCTGGAGCCTGGGACAGAAATGGGAGTGTATGATCCCGGG
 GGTATGTTTGGCAAGGATGATGGGCAGATCCAGTGGTACGGCATCATTGCCACCACCAACATGTCACTGCC
 TCAGCCTTCTGGGAAGCCATCAACCACATGTGGCATGACCACTACTACAGAGGACATGACTCCTACCTGG
 CCATCCTGCTCCCCAACCCCTTACCCGATCCCTGGGCTGTGCCGAGATCCTGGACAGTGCCTGTGGGT
 ACAGAGGACTGTGGCCACACCAAGAGATATGCAACGGGCAGCTCAAGCTAGGTCCTGTTTCTGTGCCAG
 GTTCAGCGTTCAGCCTTTACCAGGTACAGCCCTCTGAGACCATTAACCTCTCTCAGCCTTCTCGNAGC
 CCTGGGCCGGTCTCCCTGGCATCAGTGCCTTGCCTGCGGTAATGGAGGGCCCTCGTGGTGGGCTGTGCTC
 ACCATCTGTGCTGTGCTGGCCCTGTGCTGGAGGCGGGTGAAGGGGCAGAGGGCAGGGAAGAATCCAT
 TTCCAAGAGCTGCAGCTTACAACCTGCCGTAGACCCACCCGCCCATCCCTATCCACAGCTTCAGGCAGA

GCTATGAGGCCAAGAGTGTCTACGCACACCAGGCTTTCTTTTTCGCAATTCGAGGAGCTGAAGGAGGTGGGC
 AAGGAGCAGCCCAGACTGGAGGCTGAGTACGCTGCCAACACCACCAAGAACCATTACCCACATGTGCTTCC
 CTACGACCCTCCAGGGTCAGGCTGACCCAGCTGGAGGGAGAGCCCTCATCTGACTACATCAATGCCAACT
 TCATCxxxGCTACACCCACCCACCCACAGGAATTCATTGCCCTCTCAGGCGCCTCTCAAGAAAACGCTGGAG
 AACTTCTGGCGGCTGGTGGGGAGTAGCAGGTCCGCATCATCATCATGCTGACCGTGGGCATGGAGAACAG
 GAGGGTGTGTGTGAGCATTACTGGCTGACCGACTTACCCCGGTACCCCATGATCACATCACCATCCACC
 TCCTAGCCGAGGAGGCTGACGATGAGTGGACCAAGCGGGAATTCAGCTGCAGCACATGCGTGCCCCAAGG
 ATGAGGGGGTTGTCCAGCAACAGCAGCGGAGGGTGGAGTAACTGCAATTCACCACCTxxxCTGACCACAG
 CATCCTCAAGGCCCCAGCTCCCTGCTTACCTTTATGGAGCTGGTACAGGAACAGGCAAGGGCCACCAGG
 GCATGGGACCCATCCTGGTGCCTGCAGGAGGGCAGTGTGGGCATGGAGGCAGACGGGCACCTTCGTGGCC
 CTGTGAGGCTGCTGCAGCAGCTGGAGGAGGAGCAGATGGTAGATGTGTCCATGCTGTGTTCGATTCG
 GATGCACGGGCCCCCTCATGATCCAGACCTGAGCCAGTACGCTCTCCTGCACAGCTGCCTACTGAACAGA
 TTCTGGAAGGGCCCTCAACATCTCTGAGTCTTGGCCATCTCTGTGATGAACCTCGCACAGGCGTGTGCC
 AAGAGGGCAGCCAAATGCCAACGCTGGCTTCTTGAAGGAGTACGAGCTCTGTGCTGCAGGCCATCAAGGACGA
 GGCTGGCTCTTACGCACCCCTGCCTGGCTATGAGCAGGACAGCCCCATCTCCTGTGAGTCTCACTGGGACA
 CCCCAGTCTCTGGAAGCCAATGAGCTGTGCTCTGCAGGGTGGGCCCTCTGGCTGTGATCATATGGTGTG
 ACTGGCCTCGCAGGGCCAGAGGAGCTCTGGGAGCTGGTGTGGCAGCACGGGGCTCATGTGCTTGTCTCTCT
 GTGCCACTCGATGCCATGGAGAAGCCACAGGAATCTGGCCAATGGAGATGCAGCCATAGTCACAGACA
 TGGTGACAGTGCCTGGGTGGCGAGAGCAGCACAGTGGGCTGGCTCTGTGCCCTCTTCAGGGTCACACAT
 GTAGCACCAATGCCGATCATGTCTTTGCCCGAGGGGAGAGTAGGAAGGAAAGGGAGGTGCAGAGACTGCA
 GTTCCATACCTGGAGCCTGGGCATGAGCTGCCCGCCACCACCCTGCTGCCCTTCTGGCTGCTGTGGGCC
 AGTGTCTCTCGGGGCAACAGCAAGAAGCCGGGCACACTGCTCAGCCACTCCAGCAAGGGTGGCAGCCAG
 CTGGGCACCTTCTTGGCCATGGAGCAGCTGCTGCAGCAGGCAGGGTCTGAGTGCACCGTGGATGTCTTAA
 CGTGGCCCTGCAGCAGTCTCAGGCCTGTGACCTTATGACCCCAACGCTGAAGCAGTATATCTACCTTACA
 APTGTCTGAACAGCGCACTGGCAGACGGGCTGCCCTGAGTCGGxxxCACTGGTCACTGTGCAGGAGAGGT
 TTGTGCCCTGTGGGATGGGGACAGCATTCTGA

SEQ ID NO:12 (SGP024)

TCTGAAGGAGTTGGCTGGACTGGTTGTTTCATTGTATAGATGCCATGTTGGAAAGAATCAAGCATGAAAA
 AACTGTAGTAATTAATGCCTATGCAACTTAATGAGAACCAGAGGAATTACATGGTTCAAGCAGGAGACC
 AGTGTATCTCTGTCCATGATGCACTGTTAGAGGCAGTTACTTGTGTAATAACCAAGTTCCAGCTAGAAC
 TTGTATGCCTATATTANGAACTGACACAAATAGAGAGGGGACAGAAATGTCATAGGAGTGGTGTCTCAAAAT
 TAAGCATCTAATCAGCTCAAAGCTCACATCTCAGGTTTCCCTCAGTGCCAATCTTCCATGCAATAATTC

SEQ ID NO:13 (SGP006)

MALVTLQRSPTPSAASSSASNSELEAGSEEDRKLNLSESEFFMVKGAALFLQOGSSPQQRSLQHPKHHA
GDLPOHLQVMINLLRCEDEKIKLAVRLESADWADRVRYMVVVYSSGRQDTEENILLGVDFSSKESKSTIGMV
LRLWSDTKIHLGDGDFSVSTAGRMIHFKPVSVMQMSALQVHLKACEVARRHNYFPGGVALIWATYYESC
ISSEQSCINENWAMQDLESTRPDSPALFVDPKTEGERTERLIKAKLRSIMMSQDLENVTKEIRNELEKQM
NCNLKELKEFDNEMLLILGQMDKPSLIFDHLVYLGSEWNASNLLELQOGSGVDYILNVTREIDNFFPGLFAY
HNIIRVYDEETDLLAHWNEAYHFINKAKRNHSHKCLVHCKMGVSRASASTVIAYAMKEFGWPLEKAYNYVKQK
RSITRPNAGFMRQLSEYEGILDASKQRHNKLRWQQTDSSLQQPVDDFAGPGDFLPEFDPGTPESQLPFLDD
AAQPGLGPPPLCCFRRLSDPLLPSPEDETGSLVHLEDFEREALLEEAPPAEVHRPARQPQOGSSGLCEKDV
KKKLEFGSPKGRSGSLLQVEETEEREGLGAGRWGLPTQLDQNLNSENLNNSKRSCPNMGEDDAIFGIL
NKVKPSYKSCADCMYPTASGAPEASRERCEDPNAPAICTQPAFLPHITSSPVAHLASRSRVPEKPPASGPT
PPFPLPPAGSRRADTSGPGAGAALPPASALLEPSRETPKVLPKSLLLKNSHCDKNPPSTEVVIKEESSPKK
DMKPAKDLRLLFSNESEKPTTNSYLMQHQESIIQLQKAGLVRKHTKELERLKSVPADPAPPSPDGPASRL
ASLPEESQDPAALHELGLVMPQAGSDEKSEAAPASLEGGSLKSPPPFFYRLDHTSSFSKDFLKTICYTP
TSSSMSSNLTRSSSDSIHSVRGKPGLVKQRTQEIETRLRLAGLTVSSPLKRSHSLAKLGLTFTSTEDLSS
EADPSTVADSQDTTLSESSFLHEPQGTFRDPAATSKPSGKPAENLKSPPSWMSKS

SEQ ID NO:14 (SGP002)

MAHEMIGTQIVTERLVALLESGETEKVLLIDSRPFVEYNTSHILEAININCSKLMKRRLQDQKVLITELIQH
SAKHKVDIDCSQKVVVDQSSQDVASLSSDCFLTVLLGKLEKSENSVHLLAGGFAEFRCFPGLCEGKSTL
VPTCISQPCLPVANI GPTRIPLNLYLGCQRDVLNKLMOQNGIGYVNLASNTCPKPDFIPESHFLRVPVND
SFCEKILPWLDKSVDFIEKAKASNGCVLHCLAGISRSATIAIAYIMKRMDSLDEAYRFVKEKRPTISPN
FNFLGQLLDYEKKIKNOTGASGPKSKLKLHLEKPNFPVAVSEGGQKSETFLSPPCADSATSEAAGQRPV
HPASVPSVPSVQPSLLEDSPLVQALSGLHLSADRLEDSNKLKRSFSLDIKSVSYASMASLHGFSSEDA
LEYYPKPTTLDGTNKLQCFSPVQELSEQTPETSPDKKEEASIPKKLQATARPSDSQSKRLHSVTRSSSGTAQR
SLLSPLHRSGSVEDNYHTSFLFGLSTSQHLLTKSAGLGLKGWHSIDILAPQSTPSTLSSWYFATESSHFYS
ASAIYGGASAYSAYSQQLPTCGDQVYSVRRQKPSDRADSRRSWHEESPFEKQFKRRSCQMEFGESIMSE
NRSREELGKVGSSQSSFSGSMEIEVS

SEQ ID NO:15 (SGP001)

MALVTVQRSPSTPSTSSPCASEADSGEEECRSQPRISSEFLTVKGAALFLPRNGSSTPRI SHRNKHAG
DLQOHLQAMFILLRPEDNIRLAVRLESTYQNRTRYMVVVSTNGRQDTEESIVLGMDFSSNDSSTCTMGLVL
PLWSDTLIHLGDGDFSVSTDNRVHIFKPVSVMQMSALQVHLKACEVARAHNYPGSLFVTVVSYYESHI
NSDQSSVNEWAMQDVQSHRDPSEALFTDIPTERERTERLIKPKLREIMMQKDLENITKEIRTELEMQMV
CNLREFKEFDNEMIVILGQMDSPQIFEHVFLGSEWNASNLDELQNRGVRYILNVTREIDNFFPGVFEYH
NIRVYDEEATDLLAYWNDTYKFI SKAKKHGSKCLVHCKMGVSRASASTVIAYAMKEYDRAYDYKERRTVTK
PNPSPFMRQLEEYQGI LLASFLGLIHGGRDKPWGEKSTEFESVDLVSIPGSPSCCNPEKLLHISHPYLTPSI
K

SEQ ID NO:16 (SGP018)

MMAGTSCWYPSCPILGSRMTEPEKALPFVALVRDTEGQLCLPQQRQGWQVVMATRKDTEEEQVVPSEEDE
ANVRAVQAHYLRSPSPSQYSMVSDAETESIFMEPIHLSSAIAAKQIINEELKPPGVRADAECGMLESAEQ
LLVEDLYNRVREKMDDTSLYNTPCVLDLQRALVQDRQEAAPWNEVDEVWPNVFAEKSVAVNKGRLKRLGIT
HILNAAHGTGYTGPPEFYTGLEIQYLGVEVDDFPEVDISQHFRAKAYCHYIIFSCVFTSGKVLVSSEMGISR
SAVLVVAYLMI FHNMAILEALMTVRKKRAIYPNDGFLKQLRELNEKLMEEEREEDYGREGGSABAEEGEGTG
SMLGARVHALTVEEEDDSASHLSGSSLGKATQASKPLTLIDEEEEEKLYEQWKKGQGLLSDKVPQDGGGWR
SASSGQGELEDEDVERIQEWQSRNERYQAEGYRWGREEEKEEESDAGSSVGRRRRTLESSESAWESVS
SHDIWVLKQLELNRPDHGRRRRADSMSESTWDAWNERLLEIEKEASRYHAKSKREEAADRSSEAGSRV
REDDEDSVGESEASSFYNFCSRNKDKLTALERWKIKRIQFGFHKKDLGAGDSSGEPGAEAVGKPNPSDVS
TAYQAWKLRKHQKVGSENKEEVELSKGEDSALAKKRQRRLLELLERSRQTLSEESQSMASWEADSSSTASGSI
PLSAFWSADPSVSADGDTTSVLSVTSQSHRSHLSQAASNLGACSTSNPTTLPNLPVPGDITISIASIQNWIA
NVVSETLAQKQNEMLLSRSRPSVAMKAVPAASCLGDDQVSMLSGHSSSSLGGCLLPQSQARPPSSDMQSVL
SCNTTLSSPAESCRSKVRGTSKPIFSLFADNVDLKELGRKEKEMQEMELREKMSYQMEKIASDNKRSSLFK
KKVKKEDEDDGVDGDEDTDSAI GSFYSSRSNSQKPETDTCCSSLAVCDHYASGSRVGEKEMDSSINKWLSG
LRTEEKPPFQSDWSSRGKYTRSSLLRETESKSSSYKFSKSKQSEEVHLLLPKQWQLCKKHFTVLI FLH
QGGQRDAQVLQVHVQRDLKFFRGEPRALLLPDPRVLRKGRVPRTTAPKLGQVQGLGRCGRVIQVRL

SEQ ID NO:17 (SGP003)

MTSGEVRTSLKNAVSSAKRLSPKMEEEGEEEDYCTPGAFELERLFWKGSFQYTHVNEVWPVKLYIGDEATAL
DRYRLQKAGFTHVLNAAHGRWVNDTGPDIYRDMDIQYHGVEADDLPTFDLSVFFYPAAAFIDRALSDHHSK
ILVHCVMGRSRSATLVLAYLMIHKDMTLVDAIQQVAKNRCVLPNRFGLKQLRELDKQLVQRRRSQRQDGE
EEDGREL

SEQ ID NO:18 (SGP014)

MAETSLPELGGEDKATPCPSILELEELLRAGKSSCSRVDVWPNLFTGDAATANNRFELWKLGIHVLNAA
HKGLYCQGGPDFYSSVSYLGVPAHDLPDFDISAYFSSAADFIHRLALNTPGAKVLVHCVVGVRSRATLVLA
YLMHQRSLRQAVITVRQHRWVFPNRFGLHQLCRLDHWSLLPAMGLCHFATLALILLVLEALAQAQTQK
MVEAQRGVGPRACYSIWLLLAPTPLSHCLQSPQKQHQVCGDRRLKASSTNCPSEKCTAWARYSHRWAHIL
VPLKIQLRVVPDSFSQQMPETSYLTRVGPDIQCWPESWGMDSLQKQDLRRPKIHGAVQASPYQPPTLASLQ
RLLWVRQAATLNHIDEVWPSLFLGDAYAARDKSKLIQLGIHVVNAAAGKFQVDTGAKFYRGMSSLEYGIE
ADDNPFDFLSVYFLPVARYIRAALSVPQEDGHGCLFFPKGWVVOGQVADAKLVLPTRGVLVHCAMGVRSR
ATLVLAFLMICENMTLVEAIQTVAHRNICPNSGFLEQLQVLDNRLGRETGRF

SEQ ID NO:19 (SGP060)

MCPGNWLWASMTFMARFSRSSRSRSPVTRTGLEEMPTVQHPFLNVFELERLTYTGKTACNHADEVWPGLYL
GDQDMANNRRELRLRGIHVLNASHSRWRGTPEAYEGLGIRYLGVEAHDSPAFDMSIHFQTAADFIHRLALS
QPGGKILVHCAVGVRSRATLVLAYLMLYHHLTLVEAIKKVKDHGIIIPNRFGLRQLLALDRRLRQGLEA

SEQ ID NO:20 (SGP008)

MQGQTVVPKDSYTIISLIQRLRGREARRTHENLLRSLALVRSPTASIDCHTWSVSSGTNTSLQASGLGRQ
GSCDRIASRAASWGCTRTAAPGIMNGMTKVLPGLYLGNFIDAKDLDQLGRNKITHIISIHESFPQLLQDI
TYLRIPVADTPEVPIKHHFKECINFIHCCRLNNGNCLVHCFAGISRSTTIVTAYVMTVTGLGWRDVLKAIK
ATRPIANPNPGRFQQLLEFGWASSQKLRQLEERFGESPFDEEELRALPLCKRCRQSATSASSAGPHS
AASEGTVQRLVPRTPREAHRLPPLLARVKQTFSCLEPRCLSRKGGK

SEQ ID NO:21 (SGP039)

MIEDTMTLLSLLGRIMRYFLLRPETLFLLCISLALWSYFFHTDEVKTIKSSRDVAVKMKVKAETMQNDR
LGGLDVLAEAFSKTWEFKNNHNAVYSIQGRRDHMEDRFEVLTDLANKTHPSIFGI FDGHGGETAAYVKS
LPEALKQHLQDYEKDKENSVLSTYQTLLEQILSIDREMLEKLTVSYDEAGTTCIALLSDKDLTVANVGD
RGVLCQDKGNAPLSHDKPYQLKERRIKRAGGFTSENGSWRVQGIAMSRSLGDYPLKLNINVTIPDPDI
LTFDLDRLQPEFMILASDGLWDAFNEEAVRFIKERLDEPHFGAKSIVLQSFYRGCEPNIIVMVVFKFRNSS
KTEEQ

SEQ ID NO:22 (SGP040)

MLSAPCCDDRRMCVCPGPRRIGIPVRSSSLPLFSDAMPAPTQLFFPLIRNCELSRIYGTACYCHHKHLCCS
SSYIPQSRLRYTPHPAYATFCRPKENWQYTOGRYASTPQKEYLTPPQVNSILKANEYSFKVPEFDGKMS
VLSLDLTAIKLPANAPIEDRRAATCLQTRGMLLGVFDGHAGCAWSQAVSERLFYIAGSLVPHETLLEIE
NAVESGRALLPILQWHKHPNDYFSKEASKLYFNLSLRTYWQELIDLNTGESTDIDVKEALINAFKRLDNDIS
LEAQVGDPMNSFLNYLVLRVAFSGATACVAHVGDVLDHVANTGDSRAMLGVOEEDGSWSAVTLSNDHNAQNE
RELERLKLHHPKSEAKSVVKQDRLLGLLMPFRAFQDVVFKKWSIDLQKRVIESGPDQLNDNEYTKFIPPNYH
TPPYLTAEFEVTYHRLRPQDKFLVLATDGLWETMHRQDVVRLVGEYLTGMHHQPFIAVGGYKVTLGQMRGL
LTERRTKMSSVFEDQNAATHLIRHAVGNNEFGTVDHERLSKMLSLPEELARMYRDDITIIIVQFNSHVGA
YQNQEK

SEQ ID NO:23 (SGP012)

MRLPILFAALLWFRGFLAEEEACLSLEGSFGRSAGPPVNVNITSQGRPTSLFLSWAAPGPRFTHALRLT
CLSPPLSSPEGQQLQAHTNASSFKFQDLVSGGRYQLEVTALRPGQNVITILTARTAPSTVHGLQLHSGSPS
SLEASWDAPGKQDGYCLLLYHLESQTLAHNISMPGLTSLYNEGNLLPGIEYILEVNTWAGNLQATTSLHQ
WTAPVSPDHLVLHTLGTALQASWNGSKGAAWLHVLTDLLGGTNLTAVFRRGVSHHTSLHLSQGPPEYELT
LSAAARPHRAVGNATEWTTxxxDSAAKSRQSGGAKRQLDGLEASKEPGRRALLYTEGNPGLLGNISVPPGA
THITFYGPVPGARYCVDIASSLGIITYSLMGHKSPLAPQSLEVISRGGPSDLAIVWAPAPGQREGYRVAWH
QEGSQRSPGSLVDLGPDNSSLTLRSLVPGSSYAMSVWAWAENLGSIIQKIHPCxxxPLAPPLVNVVTSEGP
TQLWASVWHAPRGRDSYPVTTYLRAGTSVAVKAVASTSFSSTLPGTKYKVEVVTQAGPHHIAAANTSGWTHE
AWGEGSDAGKALHTPSELVSMHASTAVVNLAWASSPLGQGMCTQLSEAGHLSWEHPLVPGQAHLILRGLT

PGCNLSLSVLCQAGPLQASTQRVVLLVEPGFVEDVQCQPEATFLALNWTVPARDVGTCLVVAEQLVAGGNA
 HLVFQADTSKNAVLLPNLVPVTSYHLSLAVLGRNGLWSRVVTLACSTSAEAWHPPALAPAPELEPGTEMGV
 MI PRGMFGKDDGQIQWYGI IATTNMSLPQPSWEAINHMWHDHYRGHDSYLAILLPNPFY PDPWAVPRSWT
 VPVGTEDCGHTKEICNGQLKLGPVSLPRFSVAAFTRYSPPETINSFSAFSxPWAGVSLASVFLPVM EGLVV
 GCVLTICAVLGLLWCWRRVKQRAGKNPFSQELTAYNLRTHRPIPIHSFRQSYEAKSAHAHQAFELQFEELK
 EVGKEQPRLEAEYAANTTKNHYPHVLPHYDHSRVRLTQLEGEPHSDYINANFIxxxATPTHPEFFIASQAPL
 KKTLENFWRLVRE. QVRIIIMLTVMENRRVLC EHYWLT DSTPVTHDHI THLLAE EADDEWTKREFQLQH
 MRAPRMRGLSSNSGGWSNCNSPPxxxPDHSILKAPSSLLTFMELVQEQARATQGMGPILVHCRRAVWAWR
 QTGT FVALLRLQLLEEEQMVDVFHAVFAFWMHGPI MIQTL SQYVFLHSCLLNKILEGPFNISESWPISVM
 NFAQACAKRAANANAGFLKEYELLQAIKDEAGSYAFLPGYEQDSPISCESHWDTL SLNKPMSCALQGGPS
 GCDHMVLTGLAGPEELWELVWQHGAHVLSLCP LDAMEKQEFWPMEMQPIVTD MVTVHWWVAESSTVGVLC
 ALFRVTHVAMPIMISLEPEGESRKEREVQRLQFPYLEPGHEL PAT TLLPFLAAVGQCCSRGNSKKPGTLLSH
 SSKGATQLGTFLAMEQLLQAGSECTVDVFNVALQQSQACDLMTPTLKQYIYLYNCLNSALADGLPLSRxx
 xHWSL CRRGLCPVWGQHS

SEQ ID NO:24 (SGP024)

SEGVGWTCGCFIVIDAMLERIKHEKTVGNAYATLMRTQRNYMVQAGDQCI SVHDALLEAVTCVNTKVPARN
 LYAYIXKLTQIERGQNVIGVVLKFKHLISSKAHISGFLSANLPCNNF

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒト蛋白質ホスファターゼのヌクレオチド配列を示す。

【図2】 図2は、配列番号1 - 配列番号12によりコードされるヒト蛋白質ホスファターゼのアミノ酸配列を示す。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/34736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/16 C12N15/55 C07K16/40 C12Q1/42 C12Q1/68 A61K38/46		
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 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) BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data, MEDLINE, EMBL, GENSEQ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KEYSE S M: "AN EMERGING FAMILY OF DUAL SPECIFICITY MAP KINASE PHOSPHATASES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1265, 1995, pages 152-160, XP000196716 ISSN: 0167-4889 the whole document	1-29
A	COHEN P T W: "Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 22, no. 7, 1 July 1997 (1997-07-01), pages 245-251, XP004081591 ISSN: 0968-0004 the whole document	1-29
	--- -/-	
<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 :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"B" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 22 August 2001	Date of mailing of the international search report 05.09.01	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nichogiannopoulou, A	

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/34736

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>HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN R: "Protein tyrosine phosphatases: counting the trees in the forest" GENE, vol. 225, no. 1-2, 28 December 1998 (1998-12-28), pages 1-8, XP004153614 ISSN: 0378-1119 the whole document</p> <p>---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! AC No: AI651213, 5 May 1999 (1999-05-05) NCI-CGAP: "wa98a11.xl NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone" XP002167398 EST with 100% identity to SEQ ID No:1 over 617 nucleotides abstract</p> <p>---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! AC No: AC007569, 17 May 1999 (1999-05-17) MUZNY DM ET AL: "Homo sapiens chromosome 12 clone RP11-689B22" XP002167399 Sequence with 100% identity to SEQ ID No: 1 over 4067 nucleotides abstract</p> <p>---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! AC No: Q99956, 15 December 1998 (1998-12-15) MUDA M ET AL: "Dual specificity protein phosphatase 9 (Mitogen-activated protein kinase phosphatase 4)" XP002167400 Protein with 37.7% identity to SEQ ID No:13 over 183 amino acids abstract</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/34736

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 06245 A (MEDICAL RES COUNCIL, DAVIES KE; THEODOSIOU A) 20 February 1997 (1997-02-20) the whole document	1-29
X	& DATABASE EMBL 'Online! AC No: A59888, 6 March 1998 (1998-03-06) DAVIES KE & A THEODOSIOU: "Sequence 6 from Patent W09706245" Sequence with 66.4% identity with SEQ ID No:2 over 834 nucleotides abstract	1-29
X	& DATABASE GENSEQ 'Online! AC No: AAW29150, 15 December 1997 (1997-12-15) DAVIES KE & A THEODOSIOU: "Dual specific murine threonine-tyrosine phosphatase M3/6" Sequence with 45.8% identity with SEQ ID No:14 over 709 amino acids abstract	1-29
X	--- DATABASE EMBL 'Online! AC No: AC007619, 24 May 1999 (1999-05-24) MUZNY DM ET AL: "Homo sapiens 12p BAC RP11-253119" XP002175546 Sequence with 99.8% identity with SEQ ID No:2 over 1385 nucleotides abstract	1-29
X	--- DATABASE EMBL 'Online! AC No: AF086010, 3 September 1998 (1998-09-03) WOESSNER J ET AL: "Homo sapiens full length insert cDNA clone YW04H08" XP002175547 Sequence 100% identical with SEQ ID No:3 over 211 nucleotides abstract	1-29
A	--- DATABASE SWALL 'Online! DUS2_HUMAN AC No: 005923, 1 February 1994 (1994-02-01) YI H ET AL: "Dual specificity protein phosphatase 2" XP002175548 Sequence with 39.3% identity with SEQ ID No:15 over 140 amino acids abstract	1-29
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/34736

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! HS473309 AC No: N79473, 4 April 1996 (1996-04-04) HILLIER L. ET AL: "zb04d10.s1 Soares_fetal_lung_NbHL19W Homo sapiens cDNA clone" XP002175549 Sequence with 95.9% identity with SEQ ID No:4 over 369 nucleotides abstract</p> <p>---</p>	1-29
A	<p>DATABASE SWALL 'Online! DUS3_HUMAN AC No: P51452, 1 October 1996 (1996-10-01) ISHIBASHI T ET AL: "Dual specificity protein phosphatase 3" XP002175550 Sequence with 41.7% identity with SEQ ID No:16 (156 aa) 43.8% identity with SEQ ID No:17 (178 aa) 45.2% identity with SEQ ID No:18 (168 aa) 42% identity with SEQ ID No:19 (176 aa) abstract</p> <p>---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! AC No: AC018511, 15 December 1999 (1999-12-15) SMITH DR: "Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-77G23" XP002175551 Sequence with 97.7% identity with SEQ ID No:5 over 603 nucleotides abstract</p> <p>---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! AC No: AA723271, 8 January 1998 (1998-01-08) HILLIER L ET AL: "zg88b02.s1 Soares_fetal-heart_NbHH19W Homo sapiens cDNA clone" XP002175552 Sequence with 99.6% identity with SEQ ID No:6 over 465 nucleotides abstract</p> <p>---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! HS203364 AC No: W76203, 23 June 1996 (1996-06-23) HILLIER L ET AL: "zd58b10.r1 Soares_fetal-heart_NbHH19W Homo sapiens cDNA clone" XP002175553 Sequence with 98.8% identity with SEQ ID No:7 over 334 nucleotides abstract</p> <p>---</p>	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/34736

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! AC No: AI024644, 19 June 1998 (1998-06-19) NCI-CGAP: "ov60e06.x1 Scores_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone" XP002175554 Sequence with 100% homology with SEQ ID No:8 over 403 nucleotides abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-29
A	<p>DATABASE SWALL 'Online! AC No: Q9Y6W6, 1 November 1999 (1999-11-01) THEODOSIOU A ET AL: "Dual specificity phosphatase MKP-5" XP002175555 Sequence with 38% identity with SEQ ID No:20 over 145 amino acids abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! AC No: AF117832, 11 March 1999 (1999-03-11) STOTHARD PM & D PILGRIM: "Mus musculus clone mouse1-9 putative protein phosphatase type 2C mRNA" XP002175556 Sequence with 89.8% identity with SEQ ID No:9 over 501 nucleotides abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-29
X	<p>DATABASE SWALL 'Online! AC No: Q9ZGT1, 1 May 1999 (1999-05-01) STOTHARD PM & D PILGRIM: "Hypothetical 18.9 kDa protein" XP002175557 Sequence with 98.2% identity with SEQ ID No:21 over 167 amino acids abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! BTPHOS AC No: L18966, 10 November 1993 (1993-11-10) LAWSON JE ET AL: "Bos taurus pyruvate dehydrogenase phosphatase mRNA" XP002175558 sequence with 92.2% identity with SEQ ID No:10 over 1663 nucleotides abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/34736

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 SWALL 'Online! PDPI_BOVIN AC No: P35816 , 1 June 1994 (1994-06-01) LAWSON JE ET AL: "Pyruvate dehydrogenase phosphatase, catalytic subunit 1" XP002175559 Sequence with 95.5% identity with SEQ ID No:22 over 540 amino acids abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-29
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! RNOSTP AC No: L36884.1, 13 April 1995 (1995-04-13) MAURO LJ ET AL: "Rattus norvegicus protein tyrosine phosphatase mRNA" XP002175560 Sequence with 76% identity with SEQ ID No:11 over 912 nucleotides abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-29
X	<p>DATABASE GENESEQ 'Online! AC No: AAW70507, 29 December 1998 (1998-12-29) DAVIS AR ET AL: "Mutant osteotesticular protein tyrosine phosphatase protein" XP002175561 Sequence with 66.1% identity with SEQ ID No:23 over 304 amino acids abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/34736**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. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15-20 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. Claims Nos.:
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:
3. Claims Nos.:
because they are dependant 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:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. 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.:
1-29, all partially
4. 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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP006 (SEQ ID Nos:1 and 13).

2. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP002 (SEQ ID Nos:2 and 14).

3. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP001 (SEQ ID Nos:3 and 15).

4. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP018 (SEQ ID Nos:4 and 16).

5. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP003 (SEQ ID Nos:5 and 17).

6. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP014 (SEQ ID Nos:6 and 18).

7. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP060 (SEQ ID Nos:7 and 19).

8. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the dual specificity MAP kinase phosphatase SGP008 (SEQ ID Nos:8 and 20).

9. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the serine/threonine phosphatase SGP039 (SEQ ID Nos:9 and 21).

10. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the serine/threonine phosphatase SGP040 (SEQ ID Nos:10 and 22).

11. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the protein tyrosine phosphatase SGP012 (SEQ ID Nos:11 and 23).

12. Claims: 1-29 all partially

Nucleic acid molecules, recombinant cells, polypeptides, antibodies, hybridomas, kits, methods for treatment and detection related to the protein tyrosine phosphatase SGP024 (SEQ ID Nos:12 and 24).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/34736

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9706245 A	20-02-1997	AU 6664996 A	05-03-1997

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 9/02		A 6 1 P 9/12	4 H 0 4 5
9/12		15/08	
15/08		21/04	
21/04		25/00	
25/00		25/06	
25/06		25/16	
25/16		25/18	
25/18		25/28	
25/28		27/02	
27/02		29/00	
29/00		31/04	
31/04		31/10	
31/10		31/12	
31/12		35/00	
35/00		37/00	
37/00		37/06	
37/06		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/40		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		9/16	B
5/10		C 1 2 Q 1/42	
9/16		1/68	A
C 1 2 Q 1/42		G 0 1 N 33/53	M
1/68		33/566	
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		5/00	A
			B

(31)優先権主張番号 6 0 / 1 7 8 , 0 7 8

(32)優先日 平成12年1月25日(2000.1.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 6 0 / 1 7 9 , 3 0 1

(32)優先日 平成12年1月31日(2000.1.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, BZ, 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, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 プラウマン, グレゴリー・ディー
 アメリカ合衆国 94070 カリフォルニア
 州 サン カルロス, ワインディング ウ
 ェイ 35
- (72)発明者 マルティネス, リカルド
 アメリカ合衆国 94404 カリフォルニア
 州 フォスター シティ, カルティエ レ
 ーン 984
- (72)発明者 ホワイト, デイビッド
 アメリカ合衆国 94002 カリフォルニア
 州 ベルモント, バークレイ ウェイ
 2623
- (72)発明者 マニング, ジェラルド
 アメリカ合衆国 94025 カリフォルニア
 州 メンロ パーク, 4, フレモント ス
 トリート 844
- (72)発明者 シュダーサナム, スーチャ
 アメリカ合衆国 94904 カリフォルニア
 州 グリーンブレイ, コルテ パテンシオ
 20
- (72)発明者 ヒル, ロナルド・ジェイ
 アメリカ合衆国 94010 カリフォルニア
 州 バーリングゲーム, オーク グローブ
 アベニュー 532
- (72)発明者 フラナガン, ピーター
 アメリカ合衆国 94114 カリフォルニア
 州 サン フランシスコ, ハートフォード
 3, 225

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA11 BA43 CA01
CA04 CA07 CA09 CA11 DA01
DA02 DA05 DA11 EA01 EA02
EA03 EA04 FA02 GA01 GA11
HA01 HA03 HA11 HA17
4B050 CC01 CC03 CC05 DD11 FF14
LL01 LL03
4B063 QA01 QA08 QA18 QA19 QQ01
QQ05 QQ13 QQ33 QQ44 QQ52
QR08 QR13 QR33 QR42 QR55
QR57 QR59 QR62 QR74 QR80
QR82 QS05 QS25 QS34 QS36
QX02
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y
AB01 AB02 BA01 BA08 CA25
CA31 CA44 CA46
4C084 AA17 NA14 ZA012 ZA022
ZA082 ZA152 ZA162 ZA182
ZA202 ZA332 ZA362 ZA422
ZA432 ZA812 ZA942 ZB072
ZB082 ZB262 ZB322 ZB332
ZB352 ZC192 ZC212 ZC352
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40
DA76 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	哺乳动物蛋白磷酸酶		
公开(公告)号	JP2003517836A	公开(公告)日	2003-06-03
申请号	JP2001546892	申请日	2000-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	苏根公司		
申请(专利权)人(译)	Sujen公司		
[标]发明人	プラウマングレゴリーディー マルティネスリカルド ホワイトデイビッド マニングジェラルド シュダーサナムスーチャ ヒルロナルドジェイ フラナガンピーター		
发明人	プラウマン,グレゴリー・ディー マルティネス,リカルド ホワイト,デイビッド マニング,ジェラルド シュダーサナム,スーチャ ヒル,ロナルド・ジェイ フラナガン,ピーター		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P3/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/12 A61P15/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31 /10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1 /21 C12N5/10 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/55 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	A61P3/00 A61P15/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P27 /02 A61P29/00 C12N9/16		
FI分类号	A61K45/00 A61P3/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/12 A61P15/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31 /12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/16.B C12Q1/42 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5 /00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/BA43 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024 /CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024 /HA11 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/FF14 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ05 4B063 /QQ13 4B063/QQ33 4B063/QQ44 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR13 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063 /QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA082 4C084 /ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084 /ZA432 4C084/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084 /ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC192 4C084/ZC212 4C084/ZC352 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/173255 1999-12-21 US		

