

(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 - 517293

(P2003 - 517293A)

(43)公表日 平成15年5月27日(2003.5.27)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		35/76	4 B 0 2 4
35/76		39/395	D 4 B 0 5 0
38/00			N 4 B 0 6 3
38/43		45/00	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 75数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 511195(P2001 - 511195)

(86)(22)出願日 平成12年7月19日(2000.7.19)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月18日(2002.1.18)

(86)国際出願番号 PCT/US00/19710

(87)国際公開番号 W001/005983

(87)国際公開日 平成13年1月25日(2001.1.25)

(31)優先権主張番号 60/144,557

(32)優先日 平成11年7月20日(1999.7.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

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

(72)発明者 ウェイ, ボ
アメリカ合衆国 ワシントン 98034, カ
ークランド, エヌ.イー. 137ティーエイ
チ プレイス 10565

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D S P - 1 1 二重特異性M A Pキナーゼホスファターゼ

(57)【要約】

細胞増殖、細胞分化、および細胞の生存に関する状態の処置のための組成物および方法が、提供される。詳細には、二重特異性ホスファターゼD S P - 1 1、およびD S P - 1 1 基質の脱リン酸化を刺激するD S P - 1 1 のポリペプチド改変体が、提供される。これらのポリペプチドを用いて、例えば、D S P - 1 1 活性を阻害する抗体および他の薬剤を同定し得る。これらのポリペプチドおよび薬剤を用いて、細胞増殖、細胞分化、および細胞の生存を調節し得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に記載されるDSP-11の配列あるいはその改変体を有する単離されたポリペプチドであって、該改変体は、該ポリペプチドが活性化MAPキナーゼを脱リン酸化する能力を保持するように、配列番号2における残基の50%以下での1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換にて異なる、単離されたポリペプチド。

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

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

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

【請求項5】 請求項4に記載の発現ベクターを用いて形質転換されたかまたはトランスフェクトされた、宿主細胞。

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

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

【請求項8】 請求項6に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項9】 請求項8に記載の発現ベクターを用いて形質転換されたかまたはトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項10】 請求項6に記載のポリヌクレオチドに相補的な少なくとも15個連続するヌクレオチドを含む、アンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項11】 配列番号1に記載される配列の相補体に、50℃にて15分間の0.1×SSCおよび0.1%SDS中での洗浄を含む条件下で、検出可能にハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド。

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

【請求項13】 請求項12に記載の発現ベクターを用いて形質転換された

かまたはトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項14】 DSP-11ポリペプチドを産生する方法であって、以下の工程：

(a) 請求項9に記載の宿主細胞を、DSP-11ポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養する工程；および

(b) 該宿主細胞培養物から該DSP-11ポリペプチドを単離する工程、を包含する、方法。

【請求項15】 配列番号2の配列を有するDSP-11ポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

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

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

【請求項18】 サンプル中のDSP-11発現を検出するための方法であって、以下：

(a) サンプルを、請求項15に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと、抗体/DSP-11複合体を形成させるに十分な条件かつ時間で接触させる工程；および

(b) 抗体/DSP-11複合体のレベルを検出し、そしてそこからサンプル中のDSP-11の存在を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項19】 前記抗体が支持物質に連結される、請求項18に記載の方法。

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

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

【請求項22】 サンプル中のDSP-11発現を検出するための方法であ

って、以下：

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

(b) 該サンプルにおいて該アンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズするDSP-11ポリヌクレオチドの量を検出し、そしてそこから該サンプル中のDSP-11発現を検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項23】 前記アンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズするDSP-11ポリヌクレオチドの量がポリメラーゼ連鎖反応を用いて決定される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記アンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズするDSP-11ポリヌクレオチドの量がハイブリダイゼーションアッセイを用いて決定される、請求項22に記載の方法。

【請求項25】 前記サンプルがRNA調製物またはcDNA調製物を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項26】 DSP-11活性を調節する薬剤についてスクリーニングするための方法であって、以下の工程：

(a) 候補薬剤を、請求項1に記載のポリペプチドと、該ポリペプチドと候補薬剤との間での相互作用を可能にするに十分な条件かつ時間で接触させる工程；ならびに

(b) 引き続き、該ポリペプチドがDSP-11基質を脱リン化する能力を、候補薬剤の非存在下で該ポリペプチドが該DSP-11基質を脱リン酸化する予め決定された能力と比較して評価し；そしてそれからDSP-11活性を調節する薬剤を同定する工程、
を包含する、方法。

【請求項27】 前記DSP-11基質がMAPキナーゼである、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記候補薬剤が低分子である、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 前記低分子がコンビナトリアルライブラリー内に存在する

、請求項26に記載の方法。

【請求項30】 DSP-11活性を調節する薬剤についてスクリーニングするための方法であって、以下の工程：

(a) 候補薬剤を、検出可能な転写物またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたDSP-11プロモーターを含む細胞と、該プロモーターと候補薬剤との間での相互作用を可能にするに十分な条件かつ時間で接触させる工程；ならびに

(b) 引き続き、該ポリヌクレオチドの発現を、候補薬剤の非存在下での発現の予め決定されたレベルと比較して評価し；そしてそれからDSP-11活性を調節する薬剤を同定する工程、

を包含する、方法。

【請求項31】 前記ポリヌクレオチドがDSP-11ポリペプチドをコードする、請求項30に記載の方法。

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

【請求項33】 細胞における増殖応答を調節するための方法であって、細胞を、DSP-11活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項34】 細胞の分化を調節するための方法であって、細胞を、DSP-11活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項35】 細胞の生存を調節するための方法であって、細胞を、DSP-11活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する、方法。

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

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

【請求項38】 前記細胞が足場非依存性増殖を示す、請求項33～35の

いずれか1項に記載の方法。

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

【請求項40】 前記薬剤がアポトーシスを調節する、請求項35に記載の方法。

【請求項41】 前記薬剤が細胞周期を調節する、請求項35に記載の方法

。

【請求項42】 前記細胞が患者の中に存在する、請求項32に記載の方法

。

【請求項43】 DSP-11活性に関連する障害に罹患した患者を処置するための方法であって、

患者に、DSP-11活性を調節する薬剤の治療有効量を投与する工程を包含する、方法。

【請求項44】 前記障害が、デュシェーヌ筋ジストロフィー、癌、対宿主性移植片病、自己免疫疾患、アレルギー、代謝疾患、異常な細胞成長、異常な細胞増殖、および細胞周期の異常からなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 DSP-11基質捕捉変異体ポリペプチドであって、該ポリペプチドが、DSP-11と比較して実質的には減少していない親和性で基質に結合するように、かつ該ポリペプチドが、基質を脱リン酸化する能力がDSP-11と比較して低下しているように、配列番号2に記載される配列と、配列番号2における残基の50%以下での1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿入または置換にて異なっている、DSP-11基質捕捉変異体ポリペプチド。

【請求項46】 前記ポリペプチドが、配列番号2の65位または95位での置換を含む、請求項45に記載の基質捕捉変異体ポリペプチド。

【請求項47】 DSP-11と相互作用する能力について分子をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

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

(b) 該ポリペプチドへの該候補分子の結合の存在または非存在を検出し、そしてそこから該候補分子がDSP-11と相互作用するか否かを決定する工程、を包含する、方法。

【請求項48】 前記検出する工程が、アフィニティー精製工程を包含する、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 前記検出する工程が、酵母ツーハイブリットスクリーニングまたはファージディスプレイライブラリーのスクリーニングを包含する、請求項47に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

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

【0002】

(発明の背景)

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

【0003】

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

の二重特異性ホスファターゼが同定されており、これらには、MKP-1 (WO 97/00315; KeyseおよびEmslie, Nature 59:644-647, 1992)、MKP-4、MKP-5、MKP-7、Hb5 (WO 97/06245)、PAC1 (Wardら, Nature 367:651-654, 1994)、HVH2 (GuanおよびButch, J. Biol. Chem. 270:7197-7203, 1995)、およびPYST1 (Groomら, EMBO J. 15:3621-3632, 1996)など(WO95/21923を参照のこと)が含まれる。特定の二重特異性ホスファターゼの発現は、ストレスまたはマイトジェンによって誘導されるが、他の二重特異性ホスファターゼは、特定の細胞型において構成的に発現されるようである。二重特異性ホスファターゼの発現および活性の調節は、細胞増殖、細胞分化、および細胞生存を含む、MAPキナーゼ媒介性の細胞機能の制御に重要である。例えば、二重特異性ホスファターゼは、細胞増殖のネガティブレギュレーターとして機能し得る。細胞の型または活性化に関して種々の特異性を有する、多くのこのような二重特異性ホスファターゼが存在する可能性がある。しかし、二重特異性ホスファターゼの調節は、理解が乏しいままであり、そして比較的少ない数の二重特異性ホスファターゼのみしか同定されていない。

【0004】

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

【0005】

(発明の要旨)

手短に述べれば、本発明は、細胞増殖応答を調節し得る薬剤を同定するための組成物および方法を提供する。1つの局面において、本発明は、配列番号2に列

拳されるDSP-11の配列またはその改変体を有する単離されたDSP-11ポリペプチドを提供し、この改変体は、そのポリペプチドが活性化MAPキナーゼを脱リン酸化する能力を保持しているように、配列番号2の残基の50%以下の1以上アミノ酸の欠失、付加、挿入、または置換にて異なる。

【0006】

さらなる局面において、本発明は、配列番号2に対応する配列を有するポリペプチドの少なくとも10個連続するアミノ酸をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。特定の実施形態において、本発明は、配列番号2に対応する配列を有するポリペプチドの少なくとも15個連続するアミノ酸をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。特定のこのようなポリヌクレオチドは、DSP-11ポリペプチドをコードする。なおさらに、ポリヌクレオチドは、DSP-11ポリヌクレオチドの一部に相補的である少なくとも15個連続するヌクレオチドを含み、かつ/または $0.1 \times SSC$ および 0.1% SDS中で、50 で、少なくとも15分間の洗浄を含む条件下で、配列番号1に列挙される配列の相補体に検出可能にハイブリダイズする、アンチセンスポリヌクレオチドであり得る。前述のポリヌクレオチドのいずれかを含む発現ベクター、およびそのような発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞もまた、提供される。

【0007】

本発明はさらに、他の局面において、以下の工程：(a) DSP-11ポリペプチドの発現を可能にする条件下で、上記のような宿主細胞を培養する工程；および(b)上記宿主細胞培養物からDSP-11ポリペプチドを単離する工程、を包含する、DSP-11ポリペプチドを産生するための方法を提供する。

【0008】

DSP-11ポリペプチド（例えば、配列番号2の配列を有するポリペプチド）に特異的に結合する、単離された抗体およびその抗原結合フラグメントもまた、本発明によって提供される。

【0009】

本発明はさらに、他の局面において、上記のようなポリペプチド、ポリヌクレ

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

【0010】

さらなる局面において、本発明は、サンプル中のDSP-11発現を検出するための方法を提供し、この方法は、(a)抗体/DSP-11複合体の形成を可能にするのに十分な条件下かつ時間の間、サンプルを、上記のような抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる工程；および(b)抗体/DSP-11複合体のレベルを検出する工程、を包含する。

【0011】

なお他の局面において、本発明は、サンプル中のDSP-11発現を検出するための方法を提供し、この方法は、(a)サンプルを、上記のようなアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる工程；および(b)そのアンチセンスポリヌクレオチドとハイブリダイズするDSP-11ポリヌクレオチドの量を、そのサンプル中で検出する工程、を包含する。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応またはハイブリダイゼーションアッセイを用いて、そのアンチセンスポリヌクレオチドとハイブリダイズするDSP-11ポリヌクレオチドの量が決定され得る。

【0012】

本発明はまた、酵素活性および/または基質結合のモジュレーターについてのスクリーニングアッセイにおいて有用なDSP-11ポリペプチドを提供する。他の局面において、DSP-11活性を調節する薬剤についてスクリーニングするための方法もまた提供され、この方法は以下の工程を包含する：(a)候補薬剤を上記のようなDSP-11ポリペプチドと、そのポリペプチドと候補薬剤との間の相互作用を可能にするのに十分な条件下かつ時間の間、接触させる工程；および(b)続いて、候補薬剤の非存在下で、そのポリペプチドがDSP-11基質を脱リン酸化する予め決定した能力と比較して、DSP-11基質を脱リン酸化するそのポリペプチドの能力を評価する工程。このような方法は、インビトロまたは細胞環境中（例えば、インタクトな細胞中）で実施され得る。

【0013】

さらなる局面において、DSP-11活性を調節する薬剤についてスクリーニ

ングするための方法が提供され、この方法は、以下の工程を包含する：(a) 候補薬剤を、検出可能な転写物またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたDSP-11プロモーターを含む細胞と、そのプロモーターと候補薬剤との間の相互作用を可能にするに十分な条件かつ時間で、接触させる工程；ならびに引き続いて(b) 候補薬剤の非存在下での予め決定したレベルの発現と比較して、そのポリヌクレオチドの発現を評価する工程。

【0014】

また、細胞における増殖性応答を調節するための方法も提供され、その方法は、DSP-11活性を調節する薬剤と細胞を接触させる工程を包含する。

【0015】

さらなる局面において、細胞の分化を調節するための方法が提供され、その方法は、DSP-11活性を調節する薬剤と細胞を接触させる工程を包含する。

【0016】

本発明はさらに、細胞の生存を調節するための方法を提供し、その方法は、DSP-11活性を調節する薬剤と細胞を接触させる工程を包含する。

【0017】

関連する局面において、本発明は、DSP-11活性と関連する(かまたは、DSP-11の投与により処置可能な)障害に罹患した患者を処置するための方法を提供し、この方法は、DSP-11活性を調節する薬剤の治療上有効な量を患者に投与する工程を包含する。このような障害としては、デュシェーヌ筋ジストロフィー、癌、対宿主性移植片病、自己免疫疾患、アレルギー、代謝疾患、異常な細胞成長(growth)、異常な細胞増殖(proliferation)および細胞周期異常が、挙げられる。

【0018】

さらなる局面において、DSP-11基質捕捉変異体ポリペプチドが提供される。このようなポリペプチドは、そのポリペプチドが、DSP-11と比較して実質的には減少していない親和性にて基質に結合するように、かつそのポリペプチドが基質を脱リン酸化する能力は、DSP-11と比較して減少しているように、配列番号2中の残基の50%以下での1つ以上のアミノ酸の欠失、付加、挿

入または置換にて、配列番号2に記載される配列と異なる。特定の実施形態において、基質捕捉変異体ポリペプチドは、配列番号2の65位または95位の置換を含む。

【0019】

本発明はさらに、他の局面において、DSP-11と相互作用する能力について分子をスクリーニングするための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：(a)候補分子を上記のポリペプチドと、その候補分子とポリペプチドとが相互作用するのを可能にするに十分な条件かつ時間で、接触させる工程；ならびに(b)そのポリペプチドへのその候補分子の結合の存在または非存在を検出する工程。この検出工程は、例えば、アフィニティー精製工程、酵母ツーハイブリッドスクリーニング、またはファージディスプレイのスクリーニングを含み得る。

【0020】

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

【0021】

(発明の詳細な説明)

上記のように、本発明は、一般的に、インビトロおよびインビボでの細胞増殖性応答を調節(すなわち、刺激または阻害)するための、組成物および方法に関する。詳細には、本発明は、二重特異性ホスファターゼDSP-11(図1~2；配列番号1~2)、ならびにその改変体、ならびにDSP-11に特異的に結合する抗体を提供する。また、本明細書中に提供されるのは、スクリーニング、検出アッセイ、および関連する治療用途のためにこのような化合物を使用するための、方法である。

【0022】

(DSP-11ポリペプチドおよびDSP-11ポリヌクレオチド)

本明細書中で使用される場合、用語「DSP-11ポリペプチド」とは、本明

細書中に提供されるようなDSP-11配列またはそのような配列の改変体を含む、ポリペプチドをいう。このようなポリペプチドは、DSP-11基質中のチロシン残基およびスレオニン/セリン残基の両方を脱リン酸化し得、ネイティブの全長DSP-11の活性と比較して、実質的には減少していない活性を有する。DSP-11基質は、活性化(すなわち、リン酸化)MAP-キナーゼを含む。他の基質は、本明細書中で記載されるように、基質捕捉変異体を使用して同定され得、そして1つ以上のリン酸化チロシン残基、スレオニン残基および/またはセリン残基を有する、ポリペプチドを含む。

【0023】

本発明の範囲内のDSP-11ポリペプチド改変体は、1つ以上の置換、欠失、付加および/または挿入を含み得る。特定のDSP-11改変体について、この改変体が、DSP-11基質内のチロシンおよびスレオニン残基を脱リン酸化する能力は、実質的には減少しない。このようなDSP-11改変体が、DSP-11基質内のチロシンおよびスレオニン残基を脱リン酸化する能力は、ネイティブのDSP-11と比較して、増強され得るか、または無変化であり得るか、あるいは、ネイティブのDSP-11と比較して、50%未満減少され得、そして好ましくは、20%未満減少され得る。このような改変体は、本明細書中で提供される代表的なアッセイを使用して、同定され得る。

【0024】

本発明によって、特定の機能が無能力にされているDSP-11の改変された形態もまた意図される。例えば、このようなタンパク質は、構成的に活性または不活性であり得るか、あるいは、変更された結合性質または触媒性質を示し得る。このような変更されたタンパク質は、周知技術を使用して生成され得、そして変更された機能は、本明細書中で提供されるようなスクリーニングを使用して確認され得る。特定の改変されたDSP-11ポリペプチドは、「基質捕捉変異体」として公知である。このようなポリペプチドは、基質を結合する能力を保持する(すなわち、 K_m が実質的には減少していない)が、基質を脱リン酸化する能力の減少(すなわち、 k_{cat} が、好ましくは、1分当たり1未満まで減少している)を示す。さらに、基質捕捉変異体/基質複合体の安定性は、DSP-11/

基質複合体の安定性と比較して、実質的に減少していないはずである。複合体安定性は、会合定数 (K_a) に基づいて評価され得る。 K_m 、 k_{cat} および K_a の決定は、当該分野で公知の標準的な技術 (例えば、WO 98/04712 ; Lehninger, Biochemistry, 1975 Worth Publishers, NY を参照のこと) および本明細書中で提供されるアッセイを使用して、容易に達成され得る。基質捕捉変異体は、例えば、65位または95位のアミノ酸置換により DSP-11 を改変することによって (例えば、65位のアミノ酸アスパラギン酸をアラニン残基で置換することによって、または残基95のシステインをセリンで置換することによって) 生成され得る。基質捕捉変異体は、例えば、DSP-11 基質を同定するために使用され得る。手短に言えば、改変された DSP-11 が、候補基質と接触されて (単独、または細胞抽出物のようなタンパク質の混合物内で)、基質 / DSP-11 複合体の形成が可能になり得る。次いで、この複合体は、従来技術によって単離され得、基質の単離および特徴付けが可能になり得る。基質捕捉変異体の調製および使用は、例えば、PCT 公開番号 WO 98/04712 に記載される。

【0025】

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

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

【0026】

一般的に、改変は、重要でない領域において、より容易になされ得、重要でない領域とは、DSP-11の活性を実質的には変化しないネイティブ配列の領域である。重要でない領域は、本明細書中に記載されるような、特定の領域におけるDSP-11配列の改変、およびホスファターゼアッセイにおける得られた改変体の能力の評価によって同定され得る。好ましい配列改変は、活性部位ドメイン(VGVHCA LGFGRTGTMLACYLV；配列番号3)を保持するようになされる。特定の好ましい実施形態において、このような改変は、DSP-11と、DSP-11基質以外の細胞成分との間の相互作用に影響を及ぼす。しかし、置換はまた、得られた改変体が、基質脱リン酸化を刺激する能力を実質的に保持するならば、ネイティブタンパク質の重要な領域においてなされ得る。特定の実施形態において、改変体は、50%以下、好ましくは、25%以下のアミノ酸残基の、置換、欠失、付加および/または挿入を含む。

【0027】

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

【0028】

DSP-11ポリペプチドは、種々の周知技術のうちのいずれかを使用して調製され得る。以下に記載されるようなDNA配列によってコードされる組換えポリペプチドは、当業者に公知の種々の発現ベクターのうちのいずれかを使用して、それらのDNA配列から容易に調製され得る。発現は、組換えポリペプチドをコードするDNA分子を含む発現ベクターで形質転換されたかまたはトランスフ

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

【0029】

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

【0030】

「DSP-11ポリヌクレオチド」は、DSP-11ポリペプチドまたはその改変体の少なくとも一部分をコードする任意のポリヌクレオチドであるか、あるいはこのようなポリヌクレオチドに相補的である任意のポリヌクレオチドである。好ましいポリヌクレオチドは、DSP-11ポリペプチドをコードするかまたはこのような配列に相補的である、少なくとも15個連続したヌクレオチド、好ましくは、少なくとも30個連続したヌクレオチドを含む。特定のポリヌクレオチドは、DSP-11ポリペプチドをコードする；他のポリヌクレオチドは、以下に記載されるようなプローブ、プライマーまたはアンチセンスオリゴヌクレオ

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

【0031】

DSP-11ポリヌクレオチドは、ネイティブ配列（すなわち、内因性DSP-11配列あるいはその一部分またはスプライス改変体）を含み得るか、あるいはこのような配列の改変体を含み得る。ポリヌクレオチド改変体は、上記のように、コードされたポリペプチドの活性が、実質的には減少しないように、1つ以上の置換、付加、欠失および/または挿入を含み得る。コードされたポリペプチドの活性に対する効果は、一般的に、本明細書中に記載されるように評価され得る。改変体は、好ましくは、ネイティブのDSP-11またはその一部分をコードするポリヌクレオチド配列に、少なくとも約70%の同一性、より好ましくは、少なくとも約80%の同一性および最も好ましくは、少なくとも約90%の同一性を示す。パーセント同一性は、AlignまたはBLASTアルゴリズム（Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; HenikoffおよびHenikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992）のような当業者に周知のコンピュータアルゴリズムを使用して、配列を比較することによって容易に決定され得、このアルゴリズムは、NCBIウェブサイト（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>）で入手可能である。デフォルトパラメータが使用され得る。特定の改変体は、ネイティブの遺伝子に実質的に相同性である。このようなポリヌクレオチド改変体は、中程度にストリンジェントな条件下で、ネイティブのDSP-11（または、相補的配列）をコードする天然に存在するDNA配列またはRNA配列とハイブリダイズし得る。適切な中程度にストリンジェントな条件は、例えば、5×SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA（pH 8.0）の溶液中で予め洗

浄する工程；50 ~ 70 、5 × S S Cで、1 ~ 16時間ハイブリダイズする工程；その後、22 ~ 65 にて20 ~ 40分間で1回または2回、0.05 ~ 0.1% S D Sを含む2 × S S C、0.5 × S S Cおよび0.2 × S S Cの各々の1つ以上で、洗浄する工程を包含する。さらなるストリンジェンシーのために、条件は、50 ~ 60 、15 ~ 40分間の0.1 × S S Cおよび0.1% S D Sでの洗浄を含み得る。当業者に公知のように、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーの変化は、プレハイブリダイゼーション工程、ハイブリダイゼーション工程および洗浄工程のために使用される時間、温度および/または溶液の濃度を変更することによって達成され得、そして適切な条件はまた、使用されるプローブの特定のヌクレオチド配列、およびプロットされた発端 (p r o b a n d) の核酸サンプルの特定のヌクレオチド配列に部分的に依存し得る。従って、適切にストリンジェントな条件は、プローブの所望の選択性が、1つ以上の特定の発端配列にハイブリダイズするが他の特定の発端配列にはハイブリダイズしない能力に基づいて、同定される場合、過度の実験を伴わずに容易に選択され得ることが認識される。

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

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

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

【0037】

DSP-11をコードするcDNA配列を図1(配列番号1)に提供し、そして推定アミノ酸配列を図2(配列番号2)に提供する。DSP-11の活性部位VGVHCA LGFGRTGTMLACYLV(配列番号3)は、配列番号2の位置91~110に位置する。この部位にすぐ隣接する配列情報を用い、ヒトの腎臓のcDNAを用いる5'RACE反応および3'RACE反応を設計して、ヒトの腎臓および肝臓のRNAが比較的高度に豊富であることを示すmRNAに対応する、450塩基対cDNAを同定した。このcDNAは、本明細書中で二重特異性ホスファターゼ-11、すなわち、DSP-11と呼ばれる、150アミノ酸のタンパク質をコードする。図3に示す配列比較によって示されるように、DSP-11は、他のMAPキナーゼホスファターゼに対して有意な相同性を示す。

【0038】

DSP-11ポリヌクレオチド改変体は一般に、例えば、固相化学合成を含む当該分野で公知の任意の方法によって調製され得る。ポリヌクレオチド配列の改変はまた、オリゴヌクレオチド部位特異的変異誘発(oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis)のような標準的な変異誘発技術を用いて導入され得る。あるいは、RNA分子が、DSP-11をコードするDNA配列またはその部分のインビトロまたはインビボでの転写によって生成され得、但し、このDNAは、適切なRNAポ

リメラーゼプロモーター（例えば、T7またはSP6）を有するベクターに組み込まれる。特定のポリヌクレオチドを用いて、本明細書中に記載されるように、コードされるポリペプチドを調製し得る。さらに、あるいは、ポリヌクレオチドは、コードされるポリペプチドがインビボで生成されるように、患者に投与され得る。

【0039】

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

ndon, 頁97-117(1989)中のStein; Jagerら, Biochemistry 27:7237-7246(1988)を参照のこと)。

【0040】

アンチセンスポリヌクレオチドは、配列特異的な様式で、核酸(例えば、mRNAまたはDNA)に結合するオリゴヌクレオチドである。相補的配列を有するmRNAに結合した場合、アンチセンスは、そのmRNAの翻訳を妨げる(例えば、米国特許第5,168,053号、Altmanら;同第5,190,931号、Inouye,同第5,135,917号、Burch;同第5,087,617号、SmithおよびCluselら(1993)Nucleic Acids Res. 21:3405-3411(これは、ダンベル状(dumbbell)アンチセンスオリゴヌクレオチドを記載する)を参照のこと)。3重鎖分子とは、2重鎖DNAを結合して同一順序の(colinear)3重鎖分子を形成し、それによって転写を妨げる、単一のDNA鎖をいう(例えば、米国特許第5,176,996号、Hoganら(これは、2重鎖DNA上の標的部位に結合する合成オリゴヌクレオチドを作製するための方法を記載する)を参照のこと)。

【0041】

特に有用なアンチセンスヌクレオチドおよび3重鎖分子は、DSP-11ポリペプチドまたは内因性DSP-11の発現に関する任意の他のプロセスを媒介するタンパク質をコードするDNAまたはmRNAのセンス鎖と、そのDSP-11ポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の阻害がもたらされるように、相補的であるかまたは結合する分子である。アンチセンスRNAへと転写され得るcDNA構築物がまた、アンチセンスRNAの産生を容易にするために、細胞または組織中に導入され得る。アンチセンス技術は、ポリメラーゼ、転写薬剤または他の調節分子の結合の妨害を介して、遺伝子発現を調節するために使用され得る(Huber and Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, NY; 1994)中のGeeらを参照のこと)。あるいは、アンチセンス分子は、DSP-11遺伝子の制御領域(例えば、プロモー

ター、エンハンサーまたは転写開始部位)とハイブリダイズして、そしてこの遺伝子の転写をブロックするようにか;またはリボソームへの転写物の結合を阻害することにより翻訳をブロックするように設計され得る。

【0042】

本発明はまた、DSP-11-特異的リボザイムを意図する。リボザイムは、RNA基質(例えば、mRNA)を特異的に切断するRNA分子であり、細胞性遺伝子発現の特異的な阻害または妨害を生じる。RNA鎖の切断および/または連結に関与する、少なくとも5つの公知のクラスのリボザイムが存在する。リボザイムは、任意のRNA転写物に標的化され得、そしてこのような転写物を触媒作用的に切断し得る(例えば、米国特許第5,272,262号、同第5,144,019号;および同第5,168,053号、同第5,180,818号、同第5,116,742号および同第5,093,246号(Cechら)を参照のこと)。任意のDSP-11のmRNA特異的リボザイム、またはこのようなりボザイムをコードする核酸が、DSP-11遺伝子発現の阻害をもたらすために宿主細胞に送達され得る。従って、リボザイムは、真核生物プロモーター(例えば、真核生物ウイルスプロモーター)に連結されたリボザイムをコードするDNAによって宿主細胞に送達され得、その結果、核中への導入の際に、そのリボザイムは直接転写され得る。

【0043】

任意のポリヌクレオチドが、インピボでの安定性を増大するためにさらに改変され得る。可能な改変としては、これらに限定されないが、5'および/または3'末端における隣接配列の付加;骨格におけるホスホジエステル結合以外のホスホチオエート結合または2'-O-メチル結合の使用;ならびに/あるいは非伝統的(nontraditional)塩基(例えば、イノシン、キューオシン(queosine)およびワイプトシン、ならびにアセチル形態、メチル形態、チオ形態、および他の改変された形態の、アデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジン)を含むことが挙げられる。

【0044】

本明細書中に記載されるようなヌクレオチド配列は、確立された組換えDNA

技術を使用して種々の他のヌクレオチド配列と結合され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、種々のクローニングベクターのいずれか（プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体およびコスミドを含む）中にクローン化され得る。特定の目的のベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクターおよび配列決定ベクターが挙げられる。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物にて機能的な複製起点、都合の良い制限エンドヌクレアーゼ部位および1つ以上の選択可能マーカを含む。他のエレメントは、所望される使用に依存し、そして当業者に明らかである。

【0045】

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

【0046】

治療目的のための他の処方としては、コロイド分散系（例えば、高分子複合体、ナノカプセル（nanocapsule）、ミクロスフェア、ビーズ）、ならびに脂質に基づく系（水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む）が挙げられる。インビトロおよびインビボでの送達ビヒクルとしての使用のための好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち、人工膜小胞）である。このような系の調製および使用は、当該分野で周知である。

【0047】

他の局面において、DSP-11プロモーターは、標準的技術を使用して単離

され得る。本発明は、このようなプロモーター配列またはその1つ以上のシス作用調節エレメントまたはトランス作用調節エレメントを含む、核酸分子を提供する。このような調節エレメントは、DSP-11の発現を増強し得るかまたは抑制し得る。5'隣接領域は、本明細書中に提供されるゲノム配列に基づいて、標準的技術を使用して生成され得る。必要な場合、さらなる5'配列が、PCRに基づく方法または他の標準的方法を使用して生成され得る。この5'領域は、標準的な方法を使用してサブクローン化され得、そして配列決定され得る。プライマー伸長法および/またはRNアーゼプロテクション分析が使用され、cDNAから推定される転写開始部位が確認され得る。

【0048】

プロモーター領域の境界を規定するために、種々の大きさの、推定上のプロモーターインサートが、プロモーターもエンハンサーも含まない適切なレポーター遺伝子を含む異種発現系にサブクローニングされ得る。適切なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼをコードする遺伝子、 β -ガラクトシダーゼをコードする遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子、分泌アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、またはグリーン蛍光タンパク質遺伝子が挙げられ得る。適切な発現系は周知であり、そして周知の技術を用いて調製され得るか、または市販されている。内部欠失構築物が、唯一の内部制限部位を用いるか、または唯一ではない制限部位の部分的な消化により、生成され得る。次いで、構築物は、高レベルのDSP-11発現を示す細胞にトランスフェクトされ得る。一般に、最小の5'隣接領域がレポーター遺伝子の最も高い発現レベルを示す構築物は、プロモーターと定義される。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され得、そして薬剤を、DSP-11転写を調節する能力について評価するために使用され得る。

【0049】

一旦、機能的プロモーターが同定されると、シス作用エレメントおよびトランス作用エレメントが位置決定され得る。シス作用配列は、一般に、先に特徴付けされた転写モチーフに対する相同性に基づいて、同定され得る。次いで、点変異が、同定された配列内に生成されて、このような配列の調節の役割が評価され得

る。このような変異は、部位特異的変異誘発技術またはPCRに基づくストラテジーを用いて、生成され得る。次いで、変更されたプロモーターが、上記のように、レポーター遺伝子発現ベクターにクローニングされ、そしてレポーター遺伝子発現に対するこの変異の影響が評価される。

【0050】

本発明はまた、DSP-11の対立遺伝子改変体ならびに他の生物由来のDSP-11配列の使用を意図する。このような配列は、一般に、本明細書中に提供される配列に対する類似性（例えば、ハイブリダイゼーション技術を用いて）に基づき、そして本明細書中に提供されるアッセイを用いてDSP-11活性の存在に基づいて、同定され得る。

【0051】

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

【0052】

(DSP - 11 活性を検出するためのアッセイ)

本発明に従って、DSP-11の基質は、全長チロシンリン酸化タンパク質およびポリペプチドを含み得、ならびにチロシン残基においてリン酸化され得、かつ特定の好ましい実施形態においては、セリン残基またはスレオニン残基においてもリン酸化を受け得る、そのフラグメント（例えば、部分）、誘導体またはアナログを含み得る。このようなフラグメント、誘導体およびアナログとしては、例えばDSP-11と複合体を形成することによって、本明細書中に提供されるようなDSP-11と相互作用する生物学的機能を少なくとも維持する、任意の

天然に存在するDSP-11基質ポリペプチドまたは人工的に操作されたDSP-11基質ポリペプチドが挙げられる。DSP-11基質ポリペプチドのフラグメント、誘導体またはアナログ（融合タンパク質である基質を含む）は、以下のいずれかであり得る：(i) 1つ以上のアミノ酸残基が、保存アミノ酸残基もしくは非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）で置換されており、そしてこのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝コードによりコードされてもコードされなくてもよいアミノ酸残基であるもの、または(ii) 1つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii) 基質ポリペプチドが別の化合物（例えば、そのポリペプチドの半減期を増加させる化合物（例えば、ポリエチレングリコール）、またはレポーター分子のような検出可能部分）と融合されたもの、または(iv) さらなるアミノ酸（基質のポリペプチドまたはプロタンパク質配列の精製のために使用されるアミノ酸を含む）が基質のポリペプチドに融合したものの。このようなフラグメント、誘導体およびアナログは、当業者の範囲内であるとみなされる。好ましい実施形態において、MAPキナーゼポリペプチドは、本明細書中に提供されるような使用のための基質である。

【0053】

DSP-11ポリペプチド改変体は、MAPキナーゼホスファターゼ活性に適した任意のアッセイを用いて、DSP-11活性について試験され得る。このようなアッセイは、インビトロでか、または細胞に基づくアッセイにおいて、実施され得る。例えば、MAPキナーゼは、本明細書中に提供されるようなDSP-11基質として使用するために、Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY; カタログ番号14-206) から不活化形態として得られ得る。MAPキナーゼのリン酸化は、周知の技術（例えば、Zhen gおよびGuan、J. Biol. Chem. 268: 16116-16119、1993により記載されるもの）を使用して、MAPキナーゼキナーゼMEK-1 (Upstate Biotechnology; カタログ番号14-206 から入手可能) を用いて、実施され得る。

【0054】

例えば、[³²P]で放射線標識した基質（例えば、MAPキナーゼ）を、放射

線標識された活性化MAPキナーゼを生じるキナーゼ反応のために、使用し得る。次いで、DSP-11ポリペプチドは、このDSP-11ポリペプチドをMAPキナーゼと適切な条件下（例えば、Tris (pH 7.5) 1mM EDTA、1mMジチオトレイトール、1mg/mLウシ血清アルブミン、30で10分間；またはZhengおよびGuan、J. Biol. Chem. 268: 16116 - 16119、1993により記載されるような）で接触させることにより、活性化MAPキナーゼを脱リン酸する能力について試験され得る。MAPキナーゼの脱リン酸は、種々のアッセイ（例えば、連結キナーゼアッセイ（当該分野において一般的に公知の任意のアッセイを用いて、MAPキナーゼ基質のリン酸化を評価する））のいずれかを用いるか、または直接的に（（1）放射性リン酸基の損失（例えば、ゲル電気泳動、続いてオートラジオグラフィーによる）；（2）脱リン酸の後の電気泳動移動度のシフト；（3）ホスホチロシンまたはホスホスレオニンに対して特異的な抗体との反応性の損失；あるいは（4）MAPキナーゼのホスホアミノ酸分析に基づく）、検出され得る。特定のアッセイは、一般に、Wardら、Nature 367: 651 - 654、1994、またはAlessiら、Oncogene 8: 2015 - 2020、1993により記載されるように実施され得る。一般に、500pg ~ 50ngのDSP-11ポリペプチドと、100ng ~ 100μgの活性MAPキナーゼとの接触は、MAPキナーゼの検出可能な脱リン酸を、代表的には20 ~ 30分以内に生じるべきである。特定の実施形態においては、0.01 ~ 10単位/mL（好ましくは約0.1単位/mLであり、ここで単位とは、1分間あたり1nmolの基質を脱リン酸するに十分な量である）のDSP-11ポリペプチドが、0.1 ~ 10μM（好ましくは約1μM）の活性MAPキナーゼと接触されて、MAPキナーゼの検出可能な脱リン酸を生じ得る。好ましくは、DSP-11ポリペプチドは、MAPキナーゼの脱リン酸、または相当する量のネイティブなヒトDSP-11の存在下で観察される脱リン酸と少なくとも同程度のリン酸化基質（例えば、チロシンリン酸化ペプチドおよび/またはセリンリン酸化ペプチド）を生じる。本明細書中に記載のような変異をトラップする基質を使用して同定される他の基質が、このようなアッセイにおいてMAPキナーゼと置換され得ることが

、明らかである。

【0055】

(抗体および抗原結合フラグメント)

DSP-11に特異的に結合する、ペプチド、ポリペプチドおよび他の非ペプチド分子もまた、本発明により意図される。本明細書中で使用される場合、ある分子が検出可能なレベルでDSP-11と反応し、そして関連しない配列または異なるホスファターゼの配列を含むペプチドとは検出可能に反応しない場合に、この分子はDSP-11に「特異的に結合する」といわれる。好ましい結合分子としては抗体が挙げられ、これは、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、単鎖、キメラ、抗イディオタイプ、CDR移植免疫グロブリン、またはそのフラグメント(例えば、タンパク分解的に産生されたか、または組換え的に作製された免疫グロブリンF(ab')₂、Fab、Fv、およびFdフラグメント)であり得る。特定の好ましい抗体は、本明細書中で記載されるようなインビトロアッセイにおいてDSP-11の活性を阻害またはブロックする抗体である。抗体のDSP-11への結合特性は、一般に、免疫検出法(例えば、酵素結合免疫ソルベントアッセイ(ELISA)、免疫沈降、免疫ブロッティングなどを含む)を使用して評価され得、これらは当業者により容易に実施され得る。

【0056】

当該分野において周知の方法を使用して、DSP-11に特異的な抗体、ポリクローナル抗血清、またはモノクローナル抗体が産生され得る。抗体はまた、所望の特性を有するように設計された、遺伝的に操作された免疫グロブリン(Ig)またはIgフラグメントとして産生され得る。例えば、例示の目的であって限定ではないが、抗体は、第1の哺乳類種からの少なくとも1つの可変(V)領域ドメインおよび第2の異なる哺乳類種からの少なくとも1つの定常領域ドメインを有するキメラ融合タンパク質である抗体は組換えIgGを含み得る。最も一般的には、キメラ抗体は、マウス可変領域配列およびヒト定常領域配列を有する。このようなマウス/ヒトキメラ免疫グロブリンは、マウス抗体由来の相補性決定領域(CDR)を移植することによって「ヒト化」され得、これは抗原への、ヒト誘導V領域フレームワーク領域およびヒト誘導定常領域への結合特異性を与え

る。これらの分子のフラグメントは、タンパク分解性消化によって、または必要に応じて、タンパク分解性消化に続く穏やかなジスルフィド結合の還元およびアルキル化によって産生され得る。あるいは、このようなフラグメントはまた、組換え遺伝操作技術によって産生され得る。

【0057】

本明細書中で使用される場合、抗体が、DSP-11に検出可能なレベルで反応する場合、好ましくは親和性定数 K_d が約 $10^4 M^{-1}$ 以上の場合、より好ましくは約 $10^5 M^{-1}$ 以上の場合、より好ましくは約 $10^6 M^{-1}$ 以上の場合、そしてさらにより好ましくは約 $10^7 M^{-1}$ 以上の場合に、抗体はDSP-11ポリペプチドに「免疫特異的」または「特異的に結合」といわれる。結合パートナーまたは抗体の親和性は、慣習的な技術（例えば、Scatchardら（Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660(1949)）に記載される方法または表面プラズモンレゾナンス（BIAcore, Biosensor, Piscataway, NJ）を使用して容易に決定され得る。例えば、Wolffら、Cancer Res. 53:2560-2565(1993)を参照のこと。

【0058】

抗体は、一般に、当業者に公知の種々の任意の技術によって調製され得る。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)を参照のこと。このような技術の1つにおいて、動物は、抗原としてDSP-11を用いて免疫化され、ポリクローナル抗血清を産生する。適切な動物としては、例えば、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシが挙げられ、そしてより小さな哺乳類種（例えば、マウス、ラット、およびハムスター）または他の種もまた挙げられ得る。

【0059】

免疫原は、DSP-11、精製されたかまたは部分的に精製されたDSP-11ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメント（例えば、ペプチド）、あるいはDSP-11ペプチドを発現する細胞から構成され得る。DSP-11

ペプチドは、タンパク分解性切断によって産生され得るか、または化学的に合成され得る。例えば、DSP-11ポリペプチドをコードする核酸配列が本明細書中で提供され、その結果当業者は、免疫原として使用するためのこれらのポリペプチドを日常的に調製し得る。免疫化のための有用なポリペプチドまたはペプチドはまた、宿主動物において免疫原性応答をより作製しそうなアミノ酸配列を決定するために、当業者に公知の方法に従って、DSP-11の1次、2次、および3次構造を分析することによって選択され得る。例えば、Novotny、1991 Mol. Immunol. 28:201-207; Berzofsky、1985 Science 229:932-40を参照のこと。

【0060】

動物への注射のための免疫原の調製は、DSP-11ポリペプチド（またはその改変体もしくはフラグメント）の、別の免疫原性タンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシニアン（KLH）またはウシ血清アルブミン（BSA）のようなキャリアタンパク質）への共有結合を含み得る。さらに、免疫原として使用されるDSP-11ペプチド、ポリペプチド、またはDSP-11発現細胞は、アジュバント中で乳濁化され得る。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory（1988）を参照のこと。一般に、最初の注射の後に、動物は、特に抗原、アジュバント（存在する場合）、および/または特定の動物種に従って変化し得る好ましいスケジュールに従って、1つ以上のブースタ免疫化を受ける。免疫応答は、特異的抗体力価を決定するために、動物を定期的に出血させ、集めた血液から血清を分離し、そしてこの血清を免疫アッセイ（例えばELISAまたはオクタロニー拡散アッセイなど）において分析することによってモニターされ得る。一旦、抗体力価が確立されると、動物は、ポリクローナル抗血清を集めるために、定期的に出血され得る。次いで、DSP-11ポリペプチドまたはペプチドに特異的に結合するポリクローナル抗体は、このような抗血清から精製（例えば、プロテインAまたは適切な固体支持体に固定されたDSP-11ポリペプチドを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって）され得る。

【0061】

DSP-11ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体に特異的に結合するモノクローナル抗体、および所望の結合特異性を有するモノクローナル抗体を産生する不死の真核生物細胞株のハイブリドーマもまた、例えば、KohlerおよびMilstein(Nature、256:495-497;1976 Eur.J.Immunol.6:511-519(1976))の技術およびその改善方法を使用して調製され得る。動物(例えば、ラット、ハムスター、または好ましくはマウス)は、上記のように調製されたDSP-11免疫原で免疫化される。抗体形成細胞、代表的には脾臓細胞を含むリンパ細胞は、免疫化動物から得られ、そして薬物感作骨髄腫(例えば、プラズマ細胞腫)細胞融合パートナー(好ましくは、免疫化動物と同系、そして必要に応じて他の所望の性質(例えば、内因性Ig遺伝子産物の発現能力を有さない)を有するパートナー)との融合によって不死化され得る。リンパ(例えば、脾臓)細胞および骨髄腫細胞は、膜融合促進剤(例えば、ポリエチレングリコールまたは非イオン性界面活性剤)と数分間結合され得、次いでハイブリド-マ細胞の増殖を支持するが、骨髄腫細胞を融合しない選択培地上で低密度でプレートされ得る。好ましい選択培地は、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)である。十分な時間(普通約1~2週間)の後に、細胞のコロニーのが観測される。1つのコロニーを単離し、この細胞によって産生される抗体が、DSP-11ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに対する結合活性について試験され得る。高い親和性およびDSP-11抗原に対して特異的であるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが好ましい。従って、DSP-11ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、本発明によって意図される。

【0062】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養物の上清から単離され得る。マウスモノクローナル抗体の産生の代替方法は、同系マウス(例えば、このモノクローナル抗体を含む腹水の形成を促進するために処置された(例えば、プリスタン刺激された)マウス)の腹腔にこのハイブリドーマ細胞を注射することである。

従来技術（例えば、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈澱、抽出など）によって、引き続き（通常は1～3週間以内）得られた腹水から、汚染物質が除去され得る。例えば、抗体は、このモノクローナル抗体の特定の性質（例えば、重鎖または軽鎖イソタイプ、結合特異性など）に基づいて選択された適切なリガンドを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって精製され得る。固体支持体に固定される適切なリガンドの例としては、プロテインA、プロテインG、抗定常領域（軽鎖または重鎖）抗体、抗イディオタイプ抗体およびDSP-11ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体が挙げられる。

【0063】

ヒトモノクローナル抗体は、当業者が精通した多数の技術によって産生され得る。このような方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ヒト抹消血球（例えば、Bリンパ球を含む）のエプSTEIN-バーウイルス（EBV）形質転換、ヒトB細胞のインビトロ免疫化、酵母人工クロモソーム（YAC）によって挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を保有する免疫化トランスジェニックマウスからの脾臓細胞の融合、ヒト免疫グロブリンV領域ファージライブラリーからの単離、または本明細書中の開示に基づく当該分野で公知の他の手順。

【0064】

例えば、ヒトモノクローナル抗体を産生するための1つの方法としては、EBV形質転換によるヒト抹消血球の不死化が挙げられる。例えば、米国特許第4,464,456号を参照のこと。DSP-11ポリペプチド（またはその改変体もしくはフラグメント）に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する不死化細胞株は、本明細書中で提供されるような免疫検出法（例えば、ELISA）によって同定され、次いで標準的クローニング技術によって単離され得る。ヒトモノクローナル抗体を産生するための別の方法は、ヒト脾臓B細胞を抗原で刺激し、続いて刺激されたB細胞の異種ハイブリッド融合パートナーとの融合を含む、インビトロ免疫化である。例えば、Boernerら、1991 J. Immunol. 147: 86-95を参照のこと。

【0065】

本発明における使用のためのヒトDSP-11特異的モノクローナル抗体およ

びポリクローナル抗血清の産生のためのさらに別の方法は、トランスジェニックマウスに関連する。例えば、米国特許第5,877,397号; Bruggemannら、1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58; Jakobovitsら、1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:525-35を参照のこと。これらのマウスにおいて、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝操作によって生殖系列配列に人工的に導入され、そして内因性マウス免疫グロブリン遺伝子は不活性化される。例えば、Bruggemannら、1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58を参照のこと。例えば、ヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、ミニ遺伝子構築物であり得るか、または酵母人工クロモソームのトランス遺伝子座であり得、これはマウスリンパ組織におけるB細胞特異的DNA転位および過剰変異を起こす。例えば、Bruggemannら、1997 Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58を参照のこと。DSP-11に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体は、トランスジェニック動物の免疫化、脾臓細胞の骨髓腫での融合、上記のような抗体を産生する細胞の選択およびクローニングによって得られ得る。ヒト抗体を含むポリクローナル血清はまた、免疫化動物の血液から得られる。

【0066】

DSP-11(ヒト化抗体を含む)に特異的なキメラ抗体はまた、本発明に従って産生され得る。キメラ抗体は、第1の哺乳類種由来の少なくとも1つの定常領域ドメインおよび第2の異なる哺乳類種由来の少なくとも1つの可変領域ドメインを有する。例えば、Morrissonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851-55を参照のこと。好ましい実施形態において、キメラ抗体は、マウス、ラット、またはハムスターのモノクローナル抗体由来の可変領域のような非ヒトモノクローナル抗体由来の少なくとも1つの可変領域ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を、少なくとも1つのヒト定常領域をコードする核酸配列を含むベクターにクローニングすることによって構築され得る。例えば、Shinら、1989 Methods Enzymol. 178:459-76; Wallsら、1993 Nucleic A

c i d s Res . 2 1 : 2 9 2 1 - 2 9を参照のこと。例示目的として、マウスモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列は、ヒト軽鎖定常領域配列をコードする核酸配列を含むベクターに挿入され得る。別個のベクターにおいて、モノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列は、ヒトIgG1定常領域をコードする配列を有するフレームにクローンされ得る。選択された特定のヒト定常領域は、特定の抗体に対して所望されるエフェクター機能に依存し得る（例えば、相補的固定、特定のFcレセプターへの結合など）。キメラ抗体を産生するための、当該分野で公知の別の方法は、相同組換え（例えば、米国特許第5,482,856号）である。好ましくは、ベクターは、キメラ抗体の安定した発現のために、真核生物細胞にトランスフェクトされる。

【0067】

非ヒト/ヒトキメラ抗体は、「ヒト化」抗体を作製するために、さらに遺伝操作され得る。このようなヒト化抗体は、非ヒト哺乳類種の免疫グロブリン由来の複数のCDR、少なくとも1つのヒト可変フレームワーク領域、および少なくとも1つのヒト免疫グロブリン定常領域を含み得る。特定の実施形態におけるヒト化は、例えば、DSP-11結合可変領域が得られる非ヒトモノクローナル抗体、またはこのようなV領域および上記のような少なくとも1つのヒトC領域を有するキメラ抗体のいずれかと比較した場合に、DSP-11に対する減少した結合親和性を有する抗体を提供し得る。従って、ヒト化抗体の設計について有用な計略は、例えば、例示目的であって限定ではないが、キメラ抗体の非ヒトフレームワーク領域に最も相同的なヒト可変フレームワーク領域の同定が挙げられ得る。理論に束縛されることは望まないが、このような計略は、ヒト化抗体がDSP-11に対する特異的結合親和性を保持している可能性を増加し得、いくつかの好ましい実施形態において、これはDSP-11ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに対して実質的に同じ親和性であり得、そして他の特定の好ましい実施形態において、これはDSP-11に対してより大きな親和性であり得る。例えば、Jonesら、1986 Nature 321:522-25; Riechmannら、1988 Nature 332:323-27を

参照のこと。従って、このようなヒト化抗体の設計は、非ヒト可変領域のCDRループ構造および構造決定因子の決定（例えば、コンピュータモデリングによる）、次いでこのCDRループおよび決定因子の、公知のヒトCDRループ構造および決定因子との比較を含み得る。例えば、Padlanら、1995 FASEB 9:133-39; Chothiaら、1989 Nature、342:377-383を参照のこと。コンピュータモデリングはまた、非ヒト可変領域での配列相同性によって選択されたヒト構造テンプレートを比較するために使用され得る。例えば、Bajorathら、1995 Ther. Immunol. 2:95-103; EP-0578515-A3を参照のこと。非ヒトCDRのヒト化が結合親和性の減少を生じる場合、コンピュータモデリングは、親和性を部分的に、完全に、または超えて最適に（すなわち、非ヒト化抗体よりも高いレベルまで増加）回復させるために、部位指向的または他の突然変異誘発技術によって変化され得る特異的アミノ酸残基の同定を援助し得る。当業者はこれらの技術に精通しており、そしてこのような設計計略についての多くの変化および改変を容易に理解する。

【0068】

特定の実施形態において、抗体の抗原結合フラグメントの使用が好ましくあり得る。このようなフラグメントには、FabフラグメントまたはF(ab')₂フラグメントが含まれ、これは、それぞれパepsinまたはpepsinでのタンパク分解性消化によって調製され得る。抗原結合フラグメントは、例えば、固定化ブロテインAまたはブロテインG、あるいは固定化DSP-11ポリペプチド、あるいはその適切な改変体またはフラグメントを使用するアフィニティークロマトグラフィーによってFcフラグメントから分離され得る。当業者は、日常的にかつ過度の実験なしで、例えば、本明細書中で提供される免疫検出法を使用して、得られた親和性精製抗体の特徴に基づく適切な改変体またはフラグメントを決定し得る。Fabフラグメントを産生するための代替方法としては、F(ab')₂フラグメントの穏やかな還元続くアルキル化が挙げられる。例えば、Wier、Handbook of Experimental Immunology、1986、Blackwell Scientific、Bostonを参

照のこと。

【0069】

特定の実施形態に従って、上記のIg分子の任意の非ヒト、ヒト、またはヒト化重鎖および軽鎖の可変領域は、単鎖Fv(sFv)ポリペプチドフラグメント(単鎖抗体)として構築され得る。例えば、Birdら、1988 Science 242:423-426; Hustonら、1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照のこと。多機能性sFv融合タンパク質は、sFvポリペプチドインフレームをコードするポリヌクレオチド配列の、種々の任意の公知のエフェクタータンパク質をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列への結合によって産生され得る。これらの方法は、当該分野で公知であり、そして例えばEP-B1-0318554、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号、および米国特許第5,476,786号に開示される。例示の目的として、エフェクタータンパク質は、免疫グロブリン定常領域配列を含み得る。例えば、Hollenbaughら、1995 J. Immunol. Methods 188:1-7を参照のこと。エフェクタータンパク質の他の例は酵素である。非限定的な例として、このような酵素は、治療目的のための生物学的活性を提供し得る(例えば、Simerisら、1977 Bioconj. Chem. 8:510-19を参照のこと)か、または多くの任意の周知の基質から検出可能な産物への、診断的使用のためのホースラディッシュペルオキシダーゼ触媒変換のような、検出可能な活性を提供し得る。sFv融合タンパク質のさらに他の例としては、Ig-毒素融合、または免疫毒素が挙げられ、ここで、sFvポリペプチドは毒素に結合される。適切な条件下で、細胞に対して毒性であることが同定された広範な種々のポリペプチド配列を、当業者は理解する。本明細書中で使用される場合、免疫グロブリン-毒素融合タンパク質に包含される毒性ポリペプチドは、例えば、生活機能での直接干渉によってかまたはアポトーシス誘導によって、細胞の生存を損なう様式で細胞内に導入され得る任意のポリペプチドであり得る。従って、毒素は、例えば、Pseudomonas aeruginosa外毒素A、植物ゲロニン(gelonin)、Bryonia dioicaからの

ブリオジン (bryodin) などのようなりボソーム不活性化タンパク質が挙げられ得る。例えば、Thrushら、1996 Annu. Rev. Immunol. 14:49-71; Frankelら、1996 Cancer Res. 56:926-32を参照のこと。化学治療剤、抗有糸分裂剤、抗体、アポトーシス誘導因子(または「アポトーゲン(apoptogen)」)、例えばGreenおよびReed、1998、Science 281:1309-1321を参照のこと)などを含む多数の他の毒素は、当業者に公知であり、そして本明細書中に提供される例は、本発明の範囲および精神を限定することのない例示として意図される。

【0070】

特定の実施形態において、sFvは、融合タンパク質と抗原(例えば、DSP-11)との間の特異的結合の検出を可能にするペプチドまたはポリペプチドメインに融合され得る。例えば、この融合ポリペプチドメインは、親和性タグポリペプチドであり得る。従って、結合パートナー(例えば、DSP-11)へのsFv融合タンパク質の結合は、当業者が精通する任意の種々の技術によって、アビジン、ストレプトアビジンまたはHis(例えば、ポリヒスチジン)タグのような親和性ポリペプチドまたはペプチドタグを使用して検出され得る。検出技術はまた、例えば、アビジンまたはストレプトアビジン融合タンパク質の、ビオチンまたはビオチン模倣配列への結合(例えば、Luoら、1998 J. Biotechnol. 65:225およびそこに列挙される参考文献を参照のこと)、検出可能な部分(例えば、標識部分)を有する融合タンパク質の直接共有結合的改変、特異的標識化レポーター分子への融合タンパク質の非共有結合、酵素活性を有する部分を含む融合タンパク質による検出可能な基質の酵素的改変、または融合タンパク質の固相支持体への固定(共有結合または非共有結合)を含み得る。

【0071】

従って、所望の親和性特性を有するエフェクターペプチドのような別のポリペプチドに融合した、DSP-11特異的免疫グロブリン誘導ポリペプチドを含む本発明のsFvタンパク質は、例えば、エフェクターペプチドがグルタチオン-

S - トランスフェラーゼのような酵素である融合タンパク質を含み得る。別の例として、sFv融合タンパク質はまた、Staphylococcus aureus プロテインAポリペプチドに融合されたDSP - 11 特異的Igポリペプチドを含み得；核酸をコードするプロテインAおよび免疫グロブリン定常領域に対して親和性を有する融合タンパク質の構築におけるその用途は、一般に、例えば米国特許第5,100,788号に開示される。sFv融合タンパク質の構築に有用な他の親和性ポリペプチドは、例えばWO89/03422；米国特許第5,489,528号；米国特許第5,672,691号；WO93/24631；米国特許第5,168,049号；米国特許第5,272,254号およびその他の個所に開示されるストレプトアビジン融合タンパク質、ならびにアビジン融合タンパク質（例えば、EP 511,747を参照のこと）を含み得る。本明細書中で提供されるように、sFvポリペプチド配列は、全長融合ポリペプチドを含み得そして代替的にその改変体またはフラグメントを含み得るエフェクタータンパク質配列を含む、融合ポリペプチド配列に融合され得る。

【0072】

DSP - 11 ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに特異的に結合する抗体を選択するためのさらなる方法は、ファージディスプレイである。例えば、Winterら、1994 *Annul. Rev. Immunol.* 12:433-55；Burtonら、1994 *Adv. Immunol.* 57:191-280を参照のこと。ヒトまたはマウスの免疫グロブリン可変領域遺伝子コンビナトリアルライブラリーは、DSP - 11 ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに特異的に結合するIgフラグメント（Fab、Fv、sFvまたはこれらのマルチマー）を選択するためにスクリーニングされ得るファージベクターにおいて作製され得る。例えば、米国特許第5,223,409号；Huseら、1989 *Science* 246:1275-81；Kangら、1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-66；Hoogenboomら、1992 *J. Molec. Biol.* 227:381-388；Schlebuschら、1997 *Hybridoma* 16:47-52およびこれらに列挙される参考文献を参照のこと。例

例えば、Ig 可変領域フラグメントをコードする複数のポリヌクレオチド配列を含むライブラリーは、M13またはその改変体のような糸状のバクテリオファージの遺伝子に、M13融合タンパク質を作製するために、例えばM13の遺伝子IIIIまたは遺伝子VIIIIのようなファージコートタンパク質をコードする配列を用いて、インフレームで挿入され得る。融合タンパク質は、コートタンパク質と軽鎖可変領域ドメインおよび/または重鎖可変領域ドメインとの融合物であり得る。

【0073】

特定の実施形態に従って、免疫グロブリンFabフラグメントはまた、以下のようにファージ粒子上に提示され得る。Ig 定常領域ドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、コートタンパク質を用いてインフレームでファージゲノムに挿入され得る。従って、このファージコート融合タンパク質は、Ig 軽鎖または重鎖フラグメント(Fd)と融合され得る。例えば、ヒトIgライブラリーから、ヒト 定常領域をコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも1つのファージコートタンパク質をコードする配列を用いて、インフレームでベクターに挿入され得る。さらに、または代替的に、ヒトIgG1 CH1ドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、少なくとも1つの他のファージコートタンパク質をコードする配列を用いて、インフレームで挿入され得る。次いで、可変領域ドメインをコードする複数のポリヌクレオチド配列(例えば、DNAライブラリー由来の)は、バクテリオファージコートタンパク質に融合するFabフラグメントを発現するために、定常領域コートタンパク質融合物を用いて、インフレームでベクターに挿入され得る。

【0074】

DSP-11ポリペプチドに結合するIgフラグメント(例えば、Ig V領域またはFab)を表示するファージは、このファージライブラリーをDSP-11またはその改変体もしくはフラグメントと混合することによって、あるいはこのファージライブラリーを、結合するのに十分な条件下および時間で固体マトリックス上に固定されたDSP-11ポリペプチドに接触させることによって、選択され得る。非結合ファージは、洗浄液によって除去され、この洗浄液は代表

的には低濃度の塩（例えば、NaCl）、好ましくは100mM未満のNaCl、より好ましくは50mM未満のNaCl、最も好ましくは10mM未満のNaClを含む緩衝液であり得るか、または塩を含まない緩衝液であり得る。次いで、特異的に結合したファージは、NaCl含有緩衝液で溶出される（例えば、段階的様式で塩濃度を増加させることによって）。代表的には、高親和性でDSP-11に結合するファージは、開放するのにより高い塩濃度を必要とする。溶出されたファージは、適切な細菌性宿主に伝播され得、そして一般に、DSP-11特異的免疫グロブリンを発現するファージの収量を増加させるために、DSP-11結合および溶出の連続的ラウンドが繰り返され得る。コンビナトリアルファージライブラリーはまた、非ヒト可変領域のヒト化のために使用され得る。例えば、Rosokら、1996 *J. Biol. Chem.* 271:22611-18; Raderら、1998 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8910-15を参照のこと。このようにして選択されたファージ中に挿入された免疫グロブリン遺伝子のDNA配列は、標準的技術によって決定され得る。Sambrookら、1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pressを参照のこと。次いで、親和性選択されたIgコード配列は、Igフラグメントの発現のために別の適切なベクター内にクローニングされ得るか、または必要に応じて、免疫グロブリン全体の鎖の発現のために、Ig定常領域を含むベクターにクローニングされ得る。

【0075】

ファージディスプレイ技術はまた、DSP-11に結合するポリペプチド、ペプチドまたは単鎖抗体を選択するために使用され得る。このようなペプチドまたは抗体をコードする候補核酸分子（例えば、DNA）が挿入され得るマルチクローニング部位を有する適切なベクターの例として、McLaffertyら、*Gene* 128:29-36、1993; Scottら、1990 *Science* 249:386-390; Smithら、1993 *Methods Enzymol.* 217:228-257; Fischら、1996、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7761-66を参照のこと。

挿入されたDNA分子は、ランダムに産生された配列を含み得るか、または本明細書中で提供されるようなDSP-11ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメントに特異的に結合する公知のペプチドまたはポリペプチドドメインの改変体をコードし得る。一般に、核酸挿入物は、60アミノ酸までのペプチド、より好ましくは3~35アミノ酸のペプチド、そしてさらにより好ましくは6~20アミノ酸のペプチドをコードする。挿入された配列によってコードされるペプチドは、バクテリオファージの表面に表示される。DSP-11ポリペプチドに対する結合ドメインを発現するファージは、上記のような固定されたDSP-11ポリペプチドへの特異的結合に基づいて選択され得る。本明細書中で提供される場合、周知の組換え遺伝技術は、そのフラグメントを含む融合タンパク質を構築するために使用され得る。例えば、産生され得るポリペプチドは、得られた産物のDSP-11に対する結合親和性を最大にするために、2つ以上の同様な、または異なる親和性選択されたDSP-11結合ペプチドドメインのタンデムアレイを含む。

【0076】

他の特定の実施形態において、本発明は、マルチマー抗体フラグメントであるDSP-11特異的抗体を意図する。有用な方法論は、一般に、例えばHaydenら、1997、Curr Opin Immunol. 9:201-12; Colomaら、1997 Nat. Biotechnol. 15:159-63に記載される。例えば、マルチマー抗体フラグメントは、ミニ抗体(miniantibodies)(米国特許第5,910,573号)またはディアボディ(diabodies)(Holligerら、1997、Cancer Immunol. Immunother. 45:128-130)を形成するためのファージ技術によって作製され得る。DSP-11特異的Fvのマルチマーまたは異なる高原特異性を有する第2のFvに非共有結合的に会合したDSP-11特異的Fvを含む二特異的抗体であるマルチマーフラグメントが、産生され得る。例えば、Koelmeijら、1999 J. Immunother. 22:514-24を参照のこと。別の例として、マルチマー抗体は、2つの単鎖抗体またはFabフラグメントを有する二特異的抗体を含み得る。特定の関連した

実施形態に従って、第1のIgフラグメントは、DSP-11ポリペプチド（またはその改変体もしくはフラグメント）上の第1抗原性決定因子に特異的であり得、一方第2Igフラグメントは、DSP-11ポリペプチドの第2抗原性決定因子に特異的であり得る。あるいは、他の特定の関連した実施形態において、第1免疫グロブリンフラグメントは、DSP-11ポリペプチドまたはその改変体もしくはフラグメント上の抗原性決定因子について特異的であり得、そして第2の免疫グロブリンフラグメントは、第2の異なる（すなわち、非DSP-11）分子上の抗原性決定因子について特異的であり得る。DSP-11に特異的に結合する二特異的抗体もまた意図され、ここで少なくとも1つの抗原結合ドメインは、融合タンパク質として存在する。

【0077】

DSP-11結合免疫グロブリン分子へのアミノ酸変異の導入は、DSP-11に対する特異性または親和性を増加するために、あるいはエフェクター機能を変えるために有用であり得る。DSP-11に対する高い親和性を有する免疫グロブリンは、特定の残基の部位指向突然変異によって産生され得る。コンピュータに補助される3次元分子モデリングは、DSP-11ポリペプチドに対する親和性を改善するために、変化されるべきアミノ酸残基を同定するために使用され得る。例えば、Mountainら、1992、Biotechnol. Genet. Eng. 10: 1-142を参照のこと。あるいは、CDRのコンビナトリアルライブラリーは、M13ファージにおいて産生され得、そして改善された親和性を有する免疫グロブリンフラグメントについてスクリーニングされる。例えば、Glaserら、1992、J. Immunol. 149: 3903-3913; Bardasら、1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3809-13; 米国特許第5,792,456号を参照のこと。

【0078】

エフェクター機能はまた、部位指向突然変異によって変化され得る。例えば、Duncanら、1988 Nature 332: 563-64; Morganら、1995 Immunology 86: 319-24; Eghteda

rzede h - Kondriら、1997 *Biotechniques* 23 : 830 - 34を参照のこと。例えば、免疫グロブリンのFcタンパク質上のグリコシル化部位の突然変異は、免疫グロブリンが相補鎖に固定する能力を変化し得る。例えば、Wrightら、1997 *Trends Biotechnol.* 15 : 26 - 32を参照のこと。定常領域ドメインにおける他の突然変異は、免疫グロブリンが相補鎖に固定する能力を変化し得るか、または抗体依存性細胞傷害性の効果を変化し得る。例えば、Duncanら、1988 *Nature* 332 : 563 - 64 ; Morganら、1995 *Immunology* 86 : 319 - 24 ; Senselら、1997 *Mol. Immunol.* 34 : 1019 - 29を参照のこと。

【0079】

本明細書中に記載されるDSP - 11に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントをコードする核酸分子は、核酸切除、連結、形質転換およびトランスフェクションのための任意の種々の周知の手順に従って、伝播されそして発現され得る。従って、特定の実施形態において、抗体フラグメントの発現は、*Escherichia coli*のような原核生物宿主において好ましくあり得る（例えば、Pluckthunら、1989 *Methods Enzymol.* 178 : 497 - 515を参照のこと）。他の特定の実施形態において、抗体またはそのフラグメントの発現は、酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*および*Pichia pastoris*）、動物細胞（哺乳動物細胞を含む）または植物細胞を含む真核生物宿主細胞において好ましくあり得る。適切な動物細胞の例としては、限定ではないが、骨髄腫、COS, CHO、またはハイブリドーマ細胞が挙げられる。植物細胞の例としては、タバコ、トウモロコシ、ダイズ、およびイネの細胞が挙げられる。当業者に公知の手法に従って、そして本開示に基づいて、核酸ベクターは、特定の宿主系において外来配列を発現するために設計され得、次いでDSP - 11結合抗体（またはそのフラグメント）をコードするポリヌクレオチド配列が挿入され得る。調節エレメントは、特定の宿主に従って変化する。

【0080】

本明細書中に記載されるDSP-11結合免疫グロブリン(またはそのフラグメント)は、酵素、細胞傷害剤、または他のレポーター分子(色素、放射性核種、発光基、蛍光基、またはビオチンなどを含む)のような検出可能な部位または標識を含み得る。DSP-11特異的免疫グロブリンまたはそのフラグメントは、診断または治療の適用のために、放射標識され得る。抗体の放射標識のための技術は、当該分野で公知である。例えば、Adams 1998 *In Vivo* 12:11-21; Hiltunen 1993 *Acta Oncol.* 32:831-9を参照のこと。治療適用は、以下に詳細に記載され、そして他の治療剤と組合わせてDSP-11結合抗体(またはそのフラグメント)の使用を含み得る。抗体またはフラグメントはまた、当該分野で公知のそして本明細書中で提供される細胞傷害剤(例えば、リボソーム不活性化タンパク質のような毒素、化学治療剤、抗縮瞳剤、抗生物質など)と組合わされ得る。

【0081】

本発明はまた、本明細書中で提供されるDSP-11またはその改変体もしくはフラグメントに特異的に結合する抗体(またはその抗原結合フラグメント)を認識する抗イディオタイプ抗体の産生を意図する。抗イディオタイプ抗体は、免疫原として抗DSP-11抗体(またはその抗原結合フラグメント)を使用し本明細書中に記載される方法によって、ポリクローナル抗体として、またはモノクローナル抗体として産生され得る。抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントはまた、上記の任意の組換え遺伝操作法によってか、またはファージディスプレイ選択によって産生され得る。抗イディオタイプ抗体は、抗DSP-11抗体のDSP-11ポリペプチドへの結合が競合的に阻害されるように、抗DSP-11抗体の抗原結合部位と反応し得る。あるいは、本明細書中で提供される抗イディオタイプ抗体は、抗DSP-11抗体のDSP-11ポリペプチドへの結合を競合的に阻害しなくてもよい。

【0082】

本明細書中で提供され、そして当該分野で周知の方法論に従って、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、DSP-11ポリペプチドの親和性単離のた

めに使用され得る。例えば、Hermansonら、Immobilized Affinity Ligand Techniques、Academic Press、Inc. New York、1992を参照のこと。手短に言うと、抗体（またはその抗原結合フラグメント）は、固体支持体材料上に固定化され得、次いで、この支持体材料は目的のポリペプチド（例えば、DSP-11）を含むサンプルと接触される。サンプルの残りからの分離に続いて、次いでこのポリペプチドは、固定化された抗体から放出される。

【0083】

（DSP-11発現を検出するための方法）

本発明の特定の局面は、診断およびアッセイの目的のために、DSP-11に対して惹起された抗体またはハイブリダイズするポリヌクレオチドを使用する方法を提供する。特定のアッセイは、DSP-11、またはそのタンパク質分解フラグメントの存在または非存在を検出するために抗体または他の薬剤を使用することを含む。あるいは、DSP-11をコードする核酸は、標準的なハイブリダイゼーションおよび/またはPCR技術を使用して検出され得る。適切なプローブおよびプライマーは、本明細書に提供されるDSP-11 cDNA配列に基づいて、当業者によって設計され得る。アッセイは、一般的に、真核生物細胞、細菌、ウイルス、このような生物から調製された抽出物および生きている生物において見出される流体のような生物学的供給源から得られる種々のサンプルのいずれかを使用して行われ得る。患者から得られ得る生物学的サンプルには、血液サンプル、生検検体、組織外植片、器官培養物および他の組織または細胞調製物が挙げられる。患者または生物学的供給源は、ヒトまたは非ヒト動物、初代細胞培養物または培養適合細胞株であり得、これには、遺伝的に操作された細胞株（染色体的に組み込まれた組換え核酸配列またはエピソーム組換え核酸配列を含み得る）、不死化または不死化可能細胞株、体細胞ハイブリッド細胞株、分化した細胞株または分化可能な細胞株、形質転換された細胞株などが挙げられるが、これらに限定されない。特定の好ましい実施形態において、患者または生物学的供給源は、ヒトであり、特に好ましい実施形態において、生物学的供給源は、哺乳動物である非ヒト動物（例えば、ゲッ歯動物（例えば、マウス、ラット、ハムス

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

【0084】

DSP-11タンパク質を検出するために、試薬は代表的には抗体であり、この抗体は、以下に記載されるように調製され得る。サンプル中のポリペプチドを検出するための抗体を使用するための、当業者に公知の種々のアッセイ形式がある。例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと。例えば、このアッセイは、ウェスタンブロット形式で実行され得、この形式において、生物学的サンプルからのタンパク質調製物を、ゲル電気泳動により分離し、適切な膜にトランスファーし、そして抗体と反応させる。次いで、膜上の抗体の存在は、以下に記載されるような適切な検出試薬を用いて検出され得る。

【0085】

別の実施形態において、アッセイは、固体支持体上に固定された抗体を使用し、標的DSP-11に結合させ、そしてサンプルの残りから取り除くことを包含する。次いで結合されたDSP-11は、レポーター基を含む第2の抗体または試薬を用いて検出され得る。あるいは、競合アッセイが利用され得る。この競合アッセイにおいて、DSP-11ポリペプチドを、レポーター基で標識し、そしてサンプルと共に抗体をインキュベートした後に固定化抗体に結合させる。このサンプルの成分が標識化ポリペプチドの抗体への結合を阻害する程度は、このサンプルの固定化抗体との反応性を示し、そして結果として、サンプル中のDSP-11のレベルを示す。

【0086】

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

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

【0087】

特定の実施形態において、サンプル中のDSP-11の検出のためのアッセイは、2つの抗体のサンドイッチアッセイである。このアッセイは、第1に固体支持体(一般的にはマイクロタイタープレートのウェル)上に固定化された抗体を生物学的サンプルと接触させる工程により実行され得、その結果、サンプル内のDSP-11は、固定化抗体に結合することが可能になる(室温での30分間のインキュベーション時間が、一般的に充分である)。次いで、結合されないサンプルを、固定化DSP-11/抗体複合体から除去し、そしてDSP-11上の異なる部位に結合し得る第2の抗体(酵素、色素、放射性核種、発光基、蛍光基、またはビオチンのようなレポーター基を含む)を添加する。次いで、固体支持体に結合したままの第2の抗体の量を、特異的レポーター基に適切な方法を用いて決定する。放射性基については、シンチレーション計数またはオートラジオグラフィ法が、一般的に適切である。分光法を使用して、色素、発光基、および蛍光基を検出し得る。ビオチンを、異なるレポーター基(一般的に放射性基もしくは蛍光基または酵素)に結合された、アビジンを使用して検出し得る。酵素レポーター基を、一般的には基質を(一般的に特定の期間)添加し、次いで、反応産物の分光分析または他の分析することにより検出し得る。周知の技術を使用して、サンプル中のDSP-11のレベルを決定するために、標準および標準添加物を使用し得る。

【0088】

本発明の関連する局面において、DSP-11およびDSP-11ホスファターゼ活性を検出するためのキットが提供される。このようなキットは、DSP-11またはDSP-11をコードする核酸のレベルを検出するために設計され得るか、または直接ホスファターゼアッセイもしくは結合ホスファターゼアッセイにおいて、DSP-11のホスファターゼ活性を検出し得る。一般的には、本発

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

【0089】

DSP-11、またはDSP-11をコードする核酸のレベルを検出するためのキットは、代表的にはDSP-11タンパク質、DSP-11DNAあるいはDSP-11RNAに結合する試薬を含む。DSP-11をコードする核酸を検出するために、試薬は、核酸プローブまたはPCRプライマーであり得る。DSP-11（タンパク質を検出するために、試薬は、代表的には抗体である。このようなキットはまた、試薬の直接的または間接的検出に適したレポーター基を含む（すなわち、レポーター基は、この試薬に共有結合で結合され得るか、または第2の分子（例えば、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリンまたはレクチン）に結合し得、この第2の分子自身が、試薬に結合し得る）。適切なレポーター基としては、酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ）、基質、補因子、インヒビター、色素、放射性核種、発光基、蛍光基およびビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。このようなレポーター基は、当業者に公知の標準的な方法を使用して、サンプル成分に対する試薬の結合を直接的または間接的に検出するために使用され得る。

【0090】

DSP-11活性を検出するためのキットは、代表的には適切な緩衝液と組合せたDSP-11基質を含む。DSP-11活性は、上記のようなホスファターゼアッセイを行う前に、DSP-11特異的抗体を用いて免疫沈降工程を実施することにより特異的に検出され得る。基質の脱リン酸化を検出する際の使用のための他の試薬もまた提供され得る。

【0091】

特定の診断アッセイにおいて、変化したDSP-11の存在または変化したレベルのDSP-11発現に基づいて、増殖障害は、患者または本明細書中に提供されるような別の生物学的供給源生物において、検出され得る。例えば、抗体は、野生型DSP-11とアミノ酸配列におけるバリエーションを有する変化したDSP-11とを識別し得る。このようなバリエーションは、増殖障害の存在、

またはこのような障害の感受性を示し得る。ハイブリダイゼーションおよび増幅技術は、同様に改変DSP-11配列を検出するために使用され得る。

【0092】

(DSP-11活性のモジュレーターを同定するための方法)

本発明の1つの局面において、DSP-11ポリペプチドは、DSP-11活性を調節する薬剤を同定するために使用され得る。このような薬剤は、MAP-キナーゼカスケードを介するシグナル変換を阻害または増強し、細胞増殖を引き起こし得る。DSP-11活性を調節する薬剤は、DSP-11の発現および/もしくは安定性、DSP-11タンパク質活性ならびに/または基質を脱リン酸化するDSP-11の能力を変化させ得る。このようなアッセイにおいてスクリーニングされ得る薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体およびその抗原結合フラグメント、例えば、触媒部位または二重リン酸化モチーフを提示する競合基質またはペプチド、DSP-11の転写および/または翻訳を妨害するアンチセンスポリヌクレオチドおよびリボザイム、ならびにDSP-11に結合し、そしてDSP-11を不活化する他の天然分子および合成分子(例えば、低分子インヒビター)。

【0093】

本発明に従うDSP-11のモジュレーターをスクリーニングする方法における使用のための候補薬剤は、「ライブラリー」または化合物、組成物もしくは分子のコレクションとして提供され得る。このような分子は、代表的には、当該分野において「低分子」として知られ、そして 10^5 ダルトン未満、好ましくは 10^4 ダルトン未満、そしてなおより好ましくは、 10^3 ダルトン未満の分子量を有する化合物を含む。例えば、試験化合物のライブラリーのメンバーは、本明細書中に提供されるような少なくとも1つのDSP-11ポリペプチドを各々含む、複数のサンプルに投与され得、次いで基質のDSP-11媒介脱リン酸化または基質へのDSP-11媒介結合を増強または阻害するそれらの能力についてアッセイされる。DSP-11機能(例えば、ホスホチロシンおよび/またはホスホセリン/スレオニン脱リン酸化)に影響を与え得るとしてこのように同定された化合物は、治療目的および/または診断目的のために役立つ。なぜなら、これら

は、DSP-11活性に関連する疾患の処置および/または検出を可能にするからである。このような化合物はまた、DSP-11に關与する分子シグナル伝達機構に関する研究、およびさらなる特異性を示す将来のDSP-11化合物の発見および開発における改良に関する研究において役立つ。

【0094】

候補薬剤はさらに、コンビナトリアルライブラリーのメンバーとして提供され得、これは、好ましくは、複数の反応容器中で行われる所定の複数の化学反応に従って調製された合成薬剤を含む。例えば、種々の出発化合物は、1以上の固相合成、記録されたランダム混合手順および記録された反応分割手段を利用して調製され得、これらは、所定の構成が、複数の順列および/または組み合わせの反応条件を帰属可能に受けることを可能にする。得られる生成物は、スクリーニングされ得、次いで反復の選択および合成手順をされ得るライブラリー（例えば、ペプチド（例えば、PCT/US91/08694、PCT/US91/04666（これらは、本明細書中でその全体を参考として援用される）を参照のこと）または本明細書中で提供されるような低分子を含み得る他の組成物（例えば、PCT/US94/08542、EP 0774464、米国特許第5,798,035号、米国特許第5,789,172号、米国特許第5,751,629号（これらは、本明細書中でその全体を参考として援用される）を参照のこと）の合成コンビナトリアルライブラリー）を構成する。このようなライブラリーの多様な分類は、確立された手順に従って調製され得、そして本開示に従うDSP-11を用いて試験され得ることを、当業者は理解する。

【0095】

特定の実施形態においては、調節薬剤は、候補薬剤を、DSP-11ポリペプチドまたはこのようなポリペプチドをコードするDSP-11ポリヌクレオチドと、インビトロまたはインビボで組み合わせ、そして候補薬剤のDSP-11ホスファターゼ活性に対する効果を、例えば、本明細書中に記載される代表的なアッセイを用いて評価することによって同定され得る。ホスファターゼ活性における増加または減少は、候補薬剤の存在下および非存在下で、本明細書中に提供される代表的なアッセイを行うことによって測定され得る。手短には、候補薬剤は

、活性DSP-11ポリペプチドと基質（例えば、リン酸化MAP-キナーゼ）の混合物中に、この混合物の1以上の成分とのプレインキュベーションありまたはなしで含まれ得る。一般的に、抗体またはこのようなアッセイにおける使用のための他の薬剤の適切な量は、約0.01 μM～約100 μMの範囲である。次いで、薬剤のDSP-11活性への効果は、基質からのホスフェートの損失を定量化し、そしてその損失を、候補薬剤の添加なしでDSP-11を用いて達成された損失と比較することによって評価され得る。あるいは、結合キナーゼアッセイが使用され得、このアッセイにおいてDSP-11活性は、MAP-キナーゼ活性に基づいて間接的に測定される。

【0096】

あるいは、DSP-11コード領域またはレポーター遺伝子と作動可能に連結されたDSP-11プロモータを含むポリヌクレオチドは、試験化合物のDSP-11転写への影響を評価するために使用され得る。このようなアッセイは、DSP-11を内因的に発現する細胞（例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物の腎臓または肝臓）またはレポーター遺伝子と連結したDSP-11プロモータを含む発現ベクターでトランスフェクトされた細胞において行われ得る。次いで、試験化合物の効果は、DSP-11またはレポーターの転写に対する効果を、例えば、ノーザンブロット分析または適切なレポーター活性アッセイを用いてアッセイすることによって評価され得る。

【0097】

DSP-11活性はまた、その発現が適切な基質の活性化に依存するレポーター遺伝子でトランスフェクトした全細胞において測定され得る。例えば、適切な細胞（すなわち、DSP-11を発現する細胞）は、レポーター遺伝子と連結された基質依存性プロモータでトランスフェクトされ得る。このような系において、レポーター遺伝子の発現（これは、当業者に周知の方法を用いて容易に検出され得る）は、基質の活性化に依存する。基質の脱リン酸化は、レポーター活性における減少に基づいて検出され得る。候補調節薬剤は、上記のようにこのような系に添加され得、DSP-11活性に対するそれらの効果を評価する。

【0098】

本発明はさらに、DSP-11と相互作用するか、またはDSP-11に結合する分子を同定するための方法を提供する。このような分子は、一般的に、少なくとも 10^4 、好ましくは、少なくとも 10^5 、より好ましくは、少なくとも 10^6 、なおより好ましくは、少なくとも 10^7 、そして最も好ましくは、少なくとも 10^8 の親和力定数(K_d)を有してDSP-11と会合する。親和力定数は、周知の技術を用いて決定され得る。相互作用分子を同定するための方法は、例えば、調節薬剤についての最初のスクリーニングとして、またはインビボでのDSP-11活性に関与する因子を同定するために使用され得る。基質捕捉のための技術(例えば、上記のようなDSP-11改変体または基質捕捉変異体を用いる)はまた、本明細書中で提供される特定の実施形態に従って意図される。標準的な結合アッセイに加えて、相互作用分子を同定するために周知である多くの他の技術(酵母ツーハイブリッドスクリーニング、ファージディスプレイおよび親和力技術を含む)が存在する。このような技術は、慣用的なプロトコルを用いて行われ得、これらのプロトコルは当業者に周知である(例えば、Bartelら、Cellular Interactions in Development: A Practical Approach、D.A. Harley(編)、Oxford University Press(Oxford, UK)、153~179頁、1993を参照のこと)。これらおよび他の技術においては、候補相互作用タンパク質(例えば、推定DSP-11基質)は、DSP-11結合タンパク質またはDSP-11相互作用タンパク質の存在についてアッセイする前に、リン酸化され得る。

【0099】

他の局面においては、本発明は、動物が機能的なDSP-11の発現も、変化したDSP-11の発現もしない、動物モデルを提供する。このような動物は、標準的な相同組換え戦略を用いて産生され得る。この様式で産生された動物モデルは、DSP-11ポリペプチドの活性およびインビボでの調節薬剤を研究するために使用され得る。

【0100】

(基質を脱リン酸化する方法)

本発明の別の局面において、DSP-11ポリペプチドは、本明細書中で提供されるDSP-11の基質を脱リン酸化するために使用され得る。1つの実施形態において、基質は、30分で10分間、適切な緩衝液（例えば、Tris、pH7.5、1mM EDTA、1mM ジチオスレイトール、1mg/mL ウシ血清アルブミン）中で基質とともにDSP-11ポリペプチドをインキュベートすることで、インビボで脱リン酸化され得る。MAPキナーゼのような、DSP-11によって脱リン酸化され得る任意の化合物が、基質として使用され得る。一般に、反応成分の量は、約50pg~約50ngのDSP-11（またはDSP-11代替形態）ポリペプチドにわたり、そして約10ng~約10μgの基質にわたり得る。次いで、脱リン酸化された基質は、例えば、親和性技術および/またはゲル電気泳動によって精製され得る。基質の脱リン酸化の程度は、[³²P]標識化基質を試験アリコートに添加し、そして本明細書中に記載されるように基質の脱リン酸化のレベルを評価することによって、一般にモニターされ得る。

【0101】

（細胞応答を調節する方法）

調節薬剤は、インビボおよびインビトロの両方の種々の状況における、細胞の増殖、分化および生存のような細胞応答を、調節、改変またはさもなくば変化（例えば、変化の増加または減少）するために使用され得る。一般に、このような応答を調節（例えば、統計的に有意な様式で増加または減少）するために、細胞は、DSP-11活性の調節を可能にするのに十分な時間および条件下で、DSP-11活性を調節する薬剤に接触される。細胞応答を調節する薬剤は、種々の方法の任意において機能し得る。例えば、薬剤は、遺伝子発現のパターンを調節し得る（すなわち、協調的様式で発現される遺伝子ファミリーまたは遺伝子の発現を増大または阻害し得る）。種々のハイブリダイゼーションおよび増幅の技術は、遺伝子発現のパターンを評価するために利用可能である。あるいは、またはさらに、薬剤は細胞のアポトーシスまたは壊死をもたらし得、そして/または細胞内の細胞サイクルの機能を調節し得る。（例えば、Ashkenaziら、1998 Science、281:1305；Thornberryら、199

8 Science 281:1312; Evanら、1998 Science 281:1317; Adamsら、1998 Science 281:1322; およびそれらに列挙される参考文献を参照のこと。)

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

【0102】

(治療方法)

1つ以上のDSP-11ポリペプチド、調節薬剤(DSP-11と特異的に結合する任意の薬剤(例えば、本明細書中に提供されるような抗体またはそのフラグメント))および/またはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび/または調節薬剤はまた、患者においてDSP-11活性を調節するためにも使用され得る。本明細書中で使用される場合、「患者」は、任意の哺乳動物(ヒトを含む)であり得、そしてDSP-11活性に関連した状態に冒され得るか、または検出可能な疾患を有さないものであり得る。従って、処置は、存在する疾患の処置であり得るか、または予防的であり得る。DSP-11活性に関連する状態としては、細胞増殖(デュシェーヌ筋ジストロフィー、癌、対宿主性移植片病(GVHD)、自己免疫疾患、アレルギーまたは免疫抑制が関与し得る他の状態を含む)、代謝疾患、異常な細胞増殖または異常な細胞分化、および細胞周期異常に関連する任意の障害が挙げられる。このような特定の障害は、正常なMAPキナーゼのホスファターゼ活性の欠損に関連し、制御されていない細胞増殖を導く。DSP-11ポリペプチドおよびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、このような障害を回復させるために使用され得る。

【0103】

患者への投与のために、1つ以上のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/または調節薬剤が、薬学的組成物として一般に処方される。薬学的組成物は、滅

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

【0104】

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

【0105】

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

【0106】

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

【0107】

DSP - 11 ポリペプチドおよび/または調節薬剤をコードするポリヌクレオ

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

【0108】

薬学的組成物内の、DSP-11ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは調節薬剤は、種々の化合物のいずれかに連結され得る。例えば、このような因子は、その薬剤の標的部位への送達を容易にする標的化部分（例えば、モノクロナール抗体またはポリクロナール抗体、タンパク質またはリポソーム）に連結され得る。本明細書中で使用される場合「標的化部分」は、任意の物質（例えば、化合物または細胞）であり得、その薬剤の標的細胞または組織への輸送を増大する薬剤と連結された場合、それによってその薬剤の局所的な濃度を上昇する。標的化部分としては、抗体またはそのフラグメント、レセプター、リガンドならびに標的組織の細胞に結合する他の分子、または標的組織の近位の細胞に結合する他の分子が挙げられる。抗体標的化因子は、インタクト（全て）な分子、そのフラグメント、またはその機能的な等価物であり得る。抗体フラグメントの例としては、 $F(ab')_2$ 、 $-Fab'$ 、 Fab および $F[v]$ フラグメントであり、これらは、従来の方法によってか、または遺伝子工学もしくはタンパク質工学によって産生され得る。結合は、一般的には、共有結合であり、そして例えば、直接縮合または他の反応によってか、二機能性リンカーまたは多機能性リンカーを手段として達成され得る。標的化部分は、薬剤が治療的利点を発揮すると予期される、細胞または組織に基づいて選択され得る。

【0109】

薬学的組成物は、処置（または予防）される疾患に適切な様式で投与され得る

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

【0110】

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

【0111】

以下の実施例は、例示の目的で提示するが、限定の目的ではない。

【0112】

(実施例)

(実施例1)

(DSP-11をコードするcDNAのクローニングおよび配列決定)

本実施例は、ヒトDSP-11をコードするcDNA分子のクローニングを示す。

【0113】

二重特異性(dual-specificity)ホスファターゼの新規な相

同姓ドメインを規定する保存された配列モチーフを以下のように同定した：二重特異性ホスファターゼは、タンパク質チロシンホスファターゼ (PTP) のより大きなファミリーに属する。このファミリーのホスファターゼは、5つの可変アミノ酸ストレッチのN末端に位置するシステイン残基、それに続くアルギニン残基を含む保存された触媒性ドメインを共有する (Faumanら、Trends In Bioch. Sci. 21: 413~417、1996)。DSPは、代表的に、PTP活性部位モチーフを含むが、他の領域においてはPTPに対する配列相同性を欠いている (Jia, Biochem. and Cell Biol. 75: 17~26, 1997)。しかし、DSPの間で保存されているコンセンサス配列は、報告されておらず、かつ上記に言及されたような公知のDSP配列の試験から明白なコンセンサス領域も報告されていない。新しいDSPファミリーメンバーの同定に有用な、より長いコンセンサスDSPアミノ酸配列モチーフを誘導するために、複数の公知のヒト二重特異性ホスファターゼ配列を整列させ、比較した。MAP-キナーゼホスファターゼ活性を有する8つの特定のヒトDSP由来の8つのアミノ酸配列のアライメント (図3) から、相同性領域を保存した候補物を同定した。PTP活性部位サインモチーフを含む、24個のアミノ酸ペプチド配列からなるこの相同性領域は、いずれかの部位に位置するDSP領域の分析に基づいた。従って、以下の配列：

NGRVLVHCOAGISRSGTNILAYLM (配列番号4)

を有する候補ペプチドを用いて、発現配列タグ (Expressed Sequence Tag) データベース (Nat. Center for Biol. Information. www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST) を検索した。この検索では、デフォルトパラメータ中の遺伝子コード縮重性を可能にする反復 (iteration) で候補ペプチドの逆翻訳を可能にするアルゴリズム (tblastn) を使用した。この検索結果は、EST AA479435を、MAP-キナーゼホスファターゼ配列の候補として同定した。さらに、EST AA479435を用いるtblastnにより、以下の配列をコードする候補部分C末端のDSP-11を含む以下のESTを同定した：AI363485、AI309010、AI341528、AI302179、A

A863013、AA341644：これらの検索でまた、特徴付けされていない(すなわち、ESTでない)部分cDNAフラグメントAF086553を同定した。このESTは、発現された遺伝子(例えば、MAP-キナーゼホスファターゼ活性を有するDSP-11をコードする遺伝子)の完全なコード領域またはPTP活性部位をコードする任意の領域を含まず、このセンス鎖もリーディングフレームも同定されなかった。

【0114】

全長コード配列を得るため、供給業者の指示に従って、5' / 3' RACEキット(Clontech, Palo Alto, CA; Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)を用いて、記載のように(Frohmanら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:8998、1988; Oharaら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:5673、1989; Lohら、Science 243:217、1989)、5' および3' RACE(rapid amplification of cDNA end: cDNA末端の迅速増幅)反応において、ヒト腎臓cDNA(ヒト腎臓RNAから逆転写される)をスクリーニングした。EST AA479435の保存された配列モチーフにすぐ隣接する配列情報を、ヒト腎臓cDNAでの5' および3' RACE反応において用いた。これには、以下のプライマー(配列番号5~7)を用いた。

【0115】

【化1】

DSP11-GSP1: 5'-CGGGTCGTAGTCGTCGGATTTTCAGCAA-3' (配列番号5)
 DSP11-GSP2: 5'-CCTCTCCCCGTGCGTTGGCCTCGT-3' (配列番号6)
 DSP11-SP5 5'-CGC ACG GGG AGA GGC TGT-3' (配列番号7)

得られたRACE 5'産物の配列は、オープンリーディングフレームの存在を示したが、この推定翻訳配列は、開始メチオニンを欠いた。停止コドンを含むオープンリーディングフレームを有するRACE 3'産物は、DSP11-SP5プライマー(配列番号7)で生じ、これにより、DSP-11コード領域3'末

端が同定されたことを示した。DSP-11コード領域5'末端を決定するために、推定配列を使用して上記のようにESTデータベースを検索し、そしてさらに、5'RACE産物を誘導する配列に対応するEST AA101787およびAA159216を同定した。DSP-11全長コード配列を確認するため、およびこれらのEST間の小さな明らかな配列の違いを説明するために、全長DSP-11タンパク質に対する以下のプライマーを、DSP-11アミノ酸末端のコード領域を確立するために設計した：

【0116】

【化2】

DSP11EX5':

5'-GAG GAA TAA TAA ATG ACC CGC TGT CCT GTG CCC TTT CCC AG-3'

(配列番号8)

DSP11EX3':

5'-TTTCGTTTCGCTGGTAGAACTGGAAGACTGCTTTC-3' (配列番号9)

プライマー対DSP11EX5' [配列番号8]およびDSP11-EX3' [配列番号9]を使用する腎臓cDNAテンプレートのPCR増幅により、推定配列を有するアンプリコンを得、この配列は、5'末端において、ATG開始コドンに対応するDSP-11の開始メチオニンおよび2塩基対の5'をコードする配列、ならびに3'末端において、C末端リジンにコードするが、設計によって停止コドンを欠く配列を含む。従って、150個のアミノ酸(図2;配列番号2)のタンパク質をコードするcDNA(図1;配列番号1)を、DSP-11として同定した。この配列は、他のMAP-キナーゼホスファターゼに対して有意に相同性を有する(図3)。同定したcDNAは、450塩基対コード領域ならびに関連する5'および3'未翻訳配列を含む(図1)。DSP-11に対応する活性部位ドメインを、配列番号1の位置273で始まるヌクレオチドによってコードされる領域に局在化した。

【0117】

半定量的RT-PCR分析を実行した。これらの分析は、分析される全ヒト組

織由来のRNAサンプル中のmRNAをコードする検出可能なDNA-11を示し、これらの組織としては、脳組織、胸腺組織、胎盤組織、骨格筋組織、精巣組織および脂肪組織が挙げられ、腎臓および肝臓においては、DSP-11発現レベルは明らかに高かった。

【0118】

(実施例2)

(ヒト組織におけるDSP-11発現)

本実施例において、DSP-11コード核酸配列が、種々の組織供給源由来のヒトポリA+RNAにハイブリダイズすることを示す。核酸ハイブリダイゼーションプローブとしての使用のため、全長DSP-11コードcDNA(配列番号1)を、Ausubelら(1998 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA)に記載のランダムプライマー方法により³²P標識した。このプローブを、検出可能なアクチンmRNAの量について基準化した、複数のヒト組織に由来するヒトポリA+RNAを含むプロット(図4、カタログ番号7759-1; Clontech, Inc., Palo Alto, CA)にハイブリダイズした。Express Hyb™溶液(Clontech)中で68℃で30分間、プロットをプレハイブリダイゼーションし、次いで、標識したプローブを用い、Express Hyb™溶液中で、68℃で1時間ハイブリダイズした。次に、このプロットを、2×SSC、0.5% SDS中で、室温にて40分間洗浄し、次いで、0.1×SSC、0.1% SDS中で50℃で40分間、2回目の洗浄をした。次いで、プロットを、Hyperfilm MP™オートラジオグラフィフィルム(Amersham Life Sciences, Arlington Hts, IL)に一晩曝露した。結果を図4に示す。ここでは、RNAのヒト組織供給源は以下のとおりであった: レーン1、He心臓; レーン2、Br脳; レーン3、Pl胎盤; レーン4、Lu肺; レーン5、Li肝臓; レーン6、SM骨格筋; レーン7、Ki腎臓; レーン8、Pa膵臓。

【0119】

(実施例3)

(成熟DSP-11変体の同定)

本実施例は、実施例1で同定されたDSP-11配列に基づく、成熟DSP-11変体の同定を記載する。全長DSP-11コードポリヌクレオチド配列(配列番号1)を、Advanced BLASTアルゴリズムおよびMus musculusに制限される生物分野のdbestオプションを用いて、検索配列としてESTデータベース(Nat. Center for Biol. Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST)に入力し、以下の2つのESTを、最も良く一致するものとして得た: AA023073およびAW258860。これら2つのEST配列の互いのアライメントおよび配列番号1とのアライメントは、AA023073の一部と配列番号1のDSP-11コード領域との間で高い相同性を示し、一方AW258860は、N末端領域から始まる配列番号1のDSP-11コード配列の大部分と高い相同性を示したが、DSP-11 C末端領域をコードする配列番号1の部分に対応するポリヌクレオチド領域を欠いた。AA023073およびAW258860は、配列番号1のヌクレオチド1~316をコードするDSP-11に対応する領域にわたってヌクレオチド配列の同一性を示し、AA023073の配列の位置に対する3'をまた、配列番号1と容易に整列化し得るが、配列番号1のヌクレオチド位置353をコードするDSP-11に対応する単一の塩基対を欠き、そして配列番号1のヌクレオチド438をコードするDSP-11に対応するヌクレオチド位置で、コード鎖におけるC G置換を含有し、これにより、どの補正がフレームシフトのために作製されるかに関係なく早熟停止コドンを下流で産生した。配列番号1のヌクレオチド316をコードするDSP-11に対応する位置から3'方向への処理により、AW258860を実質的に誘導した。

【0120】

本実施例に記載されるデータベース検索において同定される別のESTは、W41278であり、この第1ヌクレオチドを、配列番号1のDSP-11コード鎖配列における位置139のヌクレオチドで整列化し得、これにより、位置139から3'方向に移動する、DSP-11のC末端領域をコードする配列番号1

の部分と本質的に同一であることを示した。上記のように配列番号1のnt439に対応するヌクレオチド位置でAA023073コード鎖に存在するW41278は、C→G置換を欠いた。従って、ESTの配列アライメントから、マウスDSP-11改変体に対する完全コード配列より、図6(配列番号)に示されるマウスDSP-11改変ポリペプチド配列をコードする、図5(配列番号)に示される全長ヌクレオチド配列が得られることが明らかとなった。ここで、早熟停止コドンを生産するAA023073配列と同一であるミスマッチを、W41278に従って補正した。

【0121】

このマウスDSP-11改変体を分子的にクローニングするために、全長コード配列を含むポリヌクレオチドを、標準的なPCR条件(72℃のアニーリング温度、35サイクル)および以下のプライマーを使用して、マウス胎盤cDNAライブラリから増幅する：

【0122】

【化3】

mDSP-11-5':

5'-ATG GGC GTG CAA CCC CCC AAC TTC TCC-3' (配列番号)

mDSP-11-3':

5'-TCA TTT TGT TCG CTG GTA GAA CTG GAA GAC GGC C-3' (配列番号)

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

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、DSP-11についてのcDNA配列(配列番号1)を示し、開始コドンおよび終止コドンが、太字で示される。

【図2】

図2は、DSP-11の推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図3】

図3は、DSP-11と他のMAP-キナーゼホスファターゼとの間の配列類似性を示す、配列アラインメントである。

【図4】

図4は、³²P標識した全長DSP-11コード核酸配列をプローブとして使用する、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを示す。プロットは、以下のような種々の組織型由来のヒトポリA+RNAを含んだ：He心臓；Br脳；Pl胎盤；Lu肺；Li肝臓；SM骨格筋；Ki腎臓；Pa膵臓。

【図5】

図5は、マウスDSP-11変体のcDNAコード配列を示す(配列番号)。

【図6】

図6は、マウスDSP-11変体の推定アミノ酸配列を示す(配列番号)。

【図1】

DSP-11, 450 塩基対

```
TGACCCGCTG TCCTGTGCC TTCCAGCG ATGGGCTGC AGCCCCAA CTCTCTGG GTGCTCCGG GCCGGCTGG GGGACTGGG
CTGCCGGGC TCCCGCCCA CTACAGTTC CTGTTGGACC TGGGGTGGC GCACCTGGTG FCCCTGACGG AGCGCGGGC CCCTCAGAG
GACAGCTGCC CCGGCTCAC CCGCAGCG CTGGCATCC CCGACTTCTG CCGCGGGCC CCGACCAGA TCGACGGCTT CGTGCAGATC
GTGGACGAGG CCAACGCAG GGGAGAGGCT GTGGAGTGC ACTGTGCTCT GGGCTTTGG CCGACTGGCA CCATGCTGGC CTGTTACCTG
GTGAAGGAGC GGGGCTTGGC TGCAGGAGAT GCCATTGCTG AAATCCGACG ACTACGACCC GGTCCATCG AGACCTATGA GCAGGAGAAA
GCAGTCTTCC AGTTCTACCA GCGAACGAAA TAAGGGGCT TAGTACCCTT CTACCAGGCC CTCACTCCC TTCCCATGT TGTGATGGG
GCCAGAGATG AAGGGAAGTG GACTAAGTA TTAACCCTC TAGCTCCAT TGGCTGAAGA CACTGAAGTA GCCACCCCT GCAGGCAGGT
CCTGATTGAA GGGGAGGCTT GTACTGCTTT GTTGAATAAA TGAGTTTTAC GAACCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
```

Fig. 1

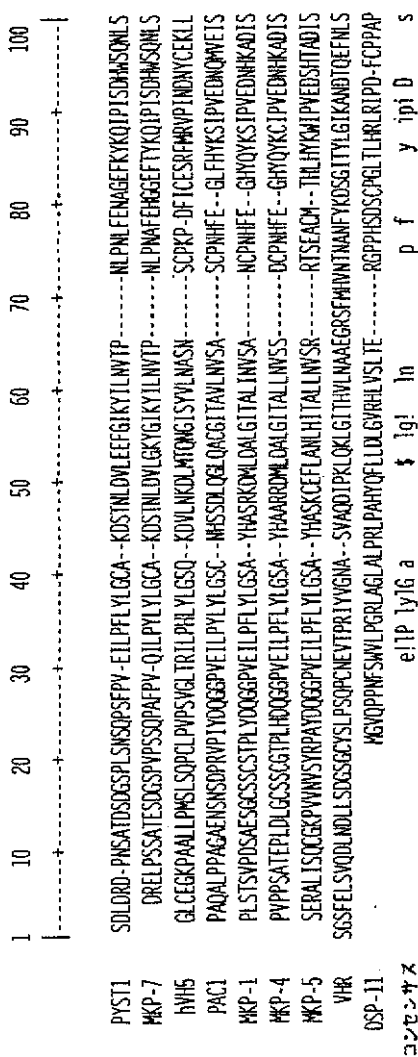
【図2】

DSP-11, 150 アミノ酸

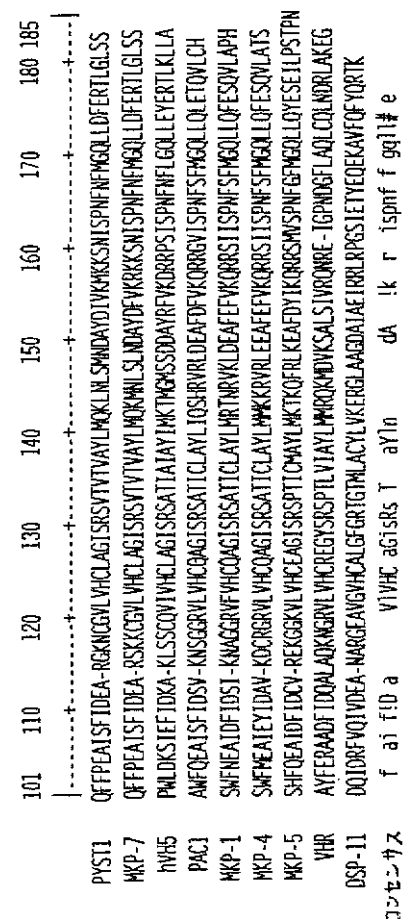
MGVQPPNFSWVLPGRLAGLALPRLPAHYQFLLDLGVRLVLSLTERGPPHSQSCPGLTLHRLRIPDFCPPAPDQIDRFVQIVDEANARGEAVGVHICALG
FGRITGTMILACYLVKRGKLAAGDAIAETIRRLRPGSITETYEQEKAVFQFYQRTK

Fig. 2

【図3】



コンセンサス



コンセンサス

Fig. 3

【図4】

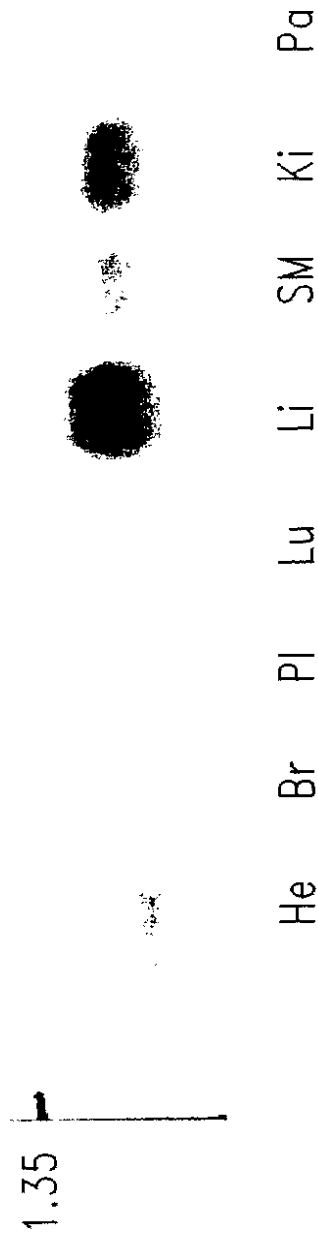


Fig. 4

【図5】

> マウス DSP-11 改変体コード配列

```
atgggcgtgcaaccccccaacttctcctgggtgcttccgggacggctggc cggactggc
gttgc cccggctgcccgcactaccagttcctgctggaccagggtgtgcggcacctgg
tgtccctgacggagcgggacccccctcacagtgacagctgtcccggcctcacgctgcac
cgaatgcgcatccctgacttttgc cccgcctcccggaaacagatcgaccaatttgtgaa
gatcgtggacgagccaatgccggggagaggctgttggagtgcactgtgccctagget
ttggccgcaactggcaccatgctagcctgctacttggtaaggagcgggctttggcgcCa
ggagatgccattgctgagatccggcctgacaccaggatccattgagacgtatgaaca
ggagaaggccgtcttccagttctaccagcgaacaaaatga
```

Fig. 5

【図6】

> マウス DSP-11 改変体コード配列

```
MGVQPPNFSWVLPGRLAGLALPRLPAHYQFLLDQGVVHLLVSLTERGPPHS DSCPGLTLH
RMRIPDFCPPSPEQIQFVKIVDEANARGEAVGVHICALGFGRTGTMLACYLVKERALAP
GDAIAEIRRLRPGSIETYEQEKAVFQFYQRTK*
```

Fig. 6

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 00/19710
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/55 C12N9/16 C12N15/11 G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/42 C07K16/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ, MEDLINE, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession AA479435, 23 June 1997 (1997-06-23) HILLIER L ET AL: "zv14e10.r1 Soares_NhHMPu_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:753642 5' similar to WP:C17G10.4A CE06845 ;, mRNA sequence." XP002155256 cited in the application 100% identity in 412 BP overlap with SEQ ID NO 1 --- -/--	2-5, 11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 December 2000		28/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inten 1st Application No
 PCT/US 00/19710

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE EMBL 'Online! Accession AK000449, 22 February 2000 (2000-02-22) SUGANO S ET AL: "Homo sapiens cDNA FLJ20442 fis, clone KAT04828" XP002155257 99.4% identity in 680 BP overlap with SEQ ID 1 and 99.3% identity in full length overlap between the translated sequence (Q9NX48) and SEQ ID NO 2 -----	1-14
A	MUDA MARCO ET AL: "Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 8, 1997, pages 5141-5151, XP002144712 ISSN: 0021-9258 abstract figure 1 figure 3B -----	1-14
A	FLINT A J ET AL: "DEVELOPMENT OF SUBSTRATE-TRAPPING MUTANTS TO IDENTIFY PHYSIOLOGICAL SUBSTRATES OF PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 94, 1 March 1997 (1997-03-01), pages 1680-1685, XP002051429 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	45, 46
A	KEYSE S M: "AN EMERGING FAMILY OF DUAL SPECIFICITY MAP KINASE PHOSPHATASES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 1265, 1995, pages 152-160, XP000196716 ISSN: 0167-4889 abstract figure 1 -----	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 33-44

Claims 33-44 were not searched because because the agent that modulates DSP-II activity is not sufficiently characterized.

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

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA36 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04
CA07 CA09 CA11 DA01 DA02
DA05 DA11 EA01 EA02 EA03
EA04 FA02 FA06 GA01 GA11
HA01 HA12 HA15
4B050 CC01 CC03 CC05 DD07 LL01
LL04
4B063 QA01 QA08 QA18 QA19 QQ01
QQ05 QQ33 QQ42 QQ52 QR07
QR08 QR13 QR33 QR42 QR55
QR57 QR59 QR62 QR74 QR80
QR82 QS05 QS15 QS25 QS34
QS36 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y
AB01 AB02 BA01 BA08 CA25
CA31 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
BA01 BA02 BA08 BA21 BA22
BA23 CA53 CA56 DC01 NA14
ZA94 ZB072 ZB082 ZB212
ZB222 ZB262 ZC192 ZC212
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 CC23
DD21 DD62 DD63 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
MA01 MA04 NA14 ZA94 ZB07
ZB08 ZB21 ZB22 ZB26 ZC21
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA10
NA14 ZA94 ZB07 ZB08 ZB21
ZB22 ZB26 ZC21
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA76 DA89 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	DSP-11双特异性MAP激酶磷酸酶		
公开(公告)号	JP2003517293A	公开(公告)日	2003-05-27
申请号	JP2001511195	申请日	2000-07-19
[标]申请(专利权)人(译)	硒Putia公司		
申请(专利权)人(译)	Seputia公司		
[标]发明人	ルチエラルフエム ウェイボ		
发明人	ルチエ, ラルフ エム. ウェイ, ボ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/43 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/00 A61P21/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/55 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P3/00 A61P21/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C12N9/16		
FI分类号	A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P3/00 A61P21/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.107 A61P43/00.111 C07K16 /40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/16.B C12Q1/02 C12Q1/42 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.A C12N5/00.A A61K37 /02 A61K37/48		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 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/FA06 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC05 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL04 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063 /QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ05 4B063/QQ33 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR07 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/QS15 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064 /DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065 /BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084 /BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DC01 4C084/NA14 4C084/ZA942 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB212 4C084/ZB222 4C084/ZB262 4C084/ZC192 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085 /EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA94 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB21 4C086/ZB22 4C086/ZB26 4C086 /ZC21 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA10 4C087/NA14 4C087/ZA94 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB21 4C087/ZB22 4C087/ZB26 4C087/ZC21 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/144557 1999-07-20 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

提供了用于治疗涉及细胞增殖，细胞分化和细胞存活的病症的组合物和方法。特别地，提供了刺激DSP-11底物的去磷酸化的双特异性磷酸酶DSP-11和DSP-11的多肽变体。这些多肽可用于例如鉴定抑制DSP-11活性的抗体和其他试剂。这些多肽和试剂可用于调节细胞增殖，细胞分化和细胞存活。