(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 33 414 T2** 2006.04.27

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 906 433 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 33 414.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/05278**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 916 257.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/035019**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.03.1997**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **25.09.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.04.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **01.06.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.04.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/55*** (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
620526 **22.03.1996** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:
Henkel, Feiler & Hänzel, 81675 München

(72) Erfinder:
LASKY, A., Laurence, Sausalito, US; CHENG, Jill, Burlingame, US

(54) Bezeichnung: **PROTEIN TYROSIN-PHOSPHATASEN VON HEMATOPOIETISCHEN ZELLEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Proteintyrosinphosphatasen. Insbesondere betrifft die Erfindung Nichtrezeptor-Proteintyrosinphosphatasen von hämopoetischen Stammzellen (PTP-HSCs).

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Fähigkeit der hämopoetischen Stammzelle, als Quelle determinierter Vorläuferzellen durchgängig während der Lebensdauer des Organismus zu funktionieren, ist derzeit ein kaum verstandenes Phänomen. Die Haupteigenschaft der hämopoetischen Stammzelle ist deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung bei nicht vorhandener Differenzierung (Morrison et al., Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 11, 35-71 [1995]). Dieses Selbsterneuerungsphänomen ist im Licht der Tatsache, dass das hämopoetischen Stroma, das in engem physischen Kontakt mit der Stammzelle steht, bekanntlich eine Quelle ist, die reich an Faktoren ist, die das Wachstum und die Differenzierung hämopoetischer Vorläuferzellen vermitteln, besonders bemerkenswert (Deryugina und Muller-Sieberg, Crit. Rev. in Immunol. 13(2), 115-150 [1993]). Beispielsweise zeigte eine jüngere PCR-Analyse von aus dem murinen Dottersack stammenden hämopoetisch aktiven Endothelzellstromalinien, dass diese Zellen eine Fülle von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren einschließlich von Stammzellfaktor, FLT-3-Ligand, M-CSF, LIF und IL-6 produzierten (Fennie et al., Blood 86(12), 4454-4467 [1995]). Von derartigen Wachstumsfaktoren ist zusätzlich zu vielen anderen bekannt, dass sie die Expansion und Differenzierung von Stammzellen induzieren, und diese Endothelzelllinien induzierten eine rasche Expansion und Differenzierung von embryonalen hämopoetischen Stammzellen längs dem Knochenmarkpfad, obwohl sehr frühe Vorläuferzellen ebenfalls durch diese Stromazellen amplifiziert werden (C. Fennie und L. Lasky – unveröffentlichte Daten). Es wurde auch gezeigt, dass die Inkubation von hoch gereinigten Stammzellpopulationen in Gegenwart verschiedener gereinigter hämopoetischer Wachstumsfaktoren eine Differenzierung mit anschließendem Verlust der Fähigkeit der Zelle zur kompetitiven Neubesiedelung des hämopoetischen Kompartiments von letal bestrahlten tierischen Lebewesen induziert, was mit der Induktion einer terminalen Differenzierung konsistent ist (Peters et al., Blood 87(1): 30-37 [1996]). Daher muss die Stammzelle, ungeachtet dessen, ob sie in einer embryonalen oder ausgewachsenen Stromaumgebung ist, einen undifferenzierten Zustand trotz der Tatsache, dass sie einer Vielzahl derartiger Reifungsfaktoren ausgesetzt ist, beibehalten (Deryugina und Muller-Sieberg, aaO).

[0003] Obwohl die hämopoetischen Wachstumsfaktoren sowohl strukturell als auch funktional sehr verschieden sind, wird angenommen, dass sie eine Rolle bei der Vermittlung von Proteinphosphorylierung spielen (Paulson und Bernstein, Semin Immunol. 7(4), 267-77 [1995]). Diese Proteinmodifikation kann über direkte Mittel, beispielsweise im Fall der Stammzellfaktor- und FLT-3-Rezeptoren, die beide intrinsische Tyrosinkinaseaktivität aufweisen, oder über indirekte Mittel, wie dies der Fall der hämopoetischen/Cytokinwachstumsfaktorrezeptoren für beispielsweise IL-3, EPO und TPO ist, erfolgen. Im Falle der hämopoetischen/Cytokinwachstumsfaktorrezeptoren wird eine Tyrosinphosphorylierung indirekt durch die Aktivierung der JAK-Kinasen, die nach der Wachstumsfaktor-vermittelten Rezeptordimerisierung erfolgt, erreicht (Ihle et al., Annu. Rev. Immunol. 13, 369-398 [1995]. In beiden Fällen werden verschiedene komplexe Pfade der Proteinphosphorylierung bei Rezeptorbindung stimuliert. Die intrinsischen Tyrosinkinaserezeptoren vermitteln ihre Signale über eine aufwändige Reihe von Tyrosinphosphorylierungsereignissen, die letztendlich den RAS-Signalisierungspfad aktivieren (Fantl et al., Ann. Rev. Biochem., 62, 453-481 [1993]. Dieser Pfad führt schließlich zur Aktivierung des Serin/Threonin-spezifischen MAP-Kinasepfads, der zur Transkriptionsaktivierung führt. Im Gegensatz zu diesem komplizierten Pfad vermittelt die durch hämopoetischen Wachstumsfaktor induzierte Rezeptordimerisierung direktere Aktivierungsereignisse. So führt die Stimulierung der JAK-Kinasen durch Rezeptorbindung zur Tyrosinphosphorylierung und anschließenden Dimerisierung verschiedener STAT-Proteine. Diese aktivierten STAT-Proteine können zum Nucleus wandern, an auf STAT regierende Stellen in der nukleären DNA binden und die Transkription von für Differenzierung und Wachstum spezifischen Genen induzieren. Daher ist eine Hauptwirkung der durch das hämopoetische Stroma produzierten Wachstumsfaktoren das Vermitteln der Aktivierung verschiedener zellulärer Pfade durch Proteinphosphorylierung.

[0004] Die Regulation der Proteintyrosinphosphorylierung wird durch eine Balance zwischen Proteintyrosinkinasen und Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) erreicht (Walton und Dixon, Ann. Rev. Biochem. 62, 101-120 [1993]; Sun und Tonks, Trends Biochem. Sci. 19(11), 480-485 [1994]. Alle PTPs enthalten eine Phosphatasedomäne, die einen Teilsatz hoch konservierter Aminosäuren umfasst, und eine kürzliche Kristallstrukturanalyse von mit einem Tyrosin-phosphorylierten Peptid komplexierter PTP 1B zeigte, dass viele dieser konservierten Reste an Substraterkennung und Tyrosindephosphorylierung beteiligt sind (Jia et al., Science 268(5218), 1754-1758 [1995]. PTPs fallen in zwei allgemeine Kategorien: Rezeptortyp und Nichtrezeptortyp. Die PTPs des Rezeptortyps besitzen extrazelluläre Domänen verschiedener Größe und allgemein zwei intrazelluläre

Phosphatasedomänen (Walton und Doxin, aaO; Sun und Tonks, aaO). Die extrazellulären Domänen enthalten häufig eine Zahl von Motiven, die allgemein bei Zelladhäsion genutzt werden, die Immunglobulindomänen und Fibronectin ähnliche Regionen umfassen. Viele dieser PTPs scheinen als homotype und heterotype Sensoren des extrazellulären Raums zu funktionieren und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie bei Kontakthemmung, Zellführung und anderen intrazellulären Funktionen eine Rolle spielen (Brady-Kalnay und Tonks, Curr. Opin. Cell. Biol. 7(5), 65-657 [1995]. Die Nichtrezeptor-PTPs sind allgemein intrazelluläre Enzyme. Sie besitzen verschiedene Zellpositionen in Abhängigkeit von den Domänetypen, die sie enthalten, und einige der Enzyme enthalten SH2-Motive, die eine innige Wechselwirkung derselben mit Phosphotyrosinresten ermöglichen. Während viele der Nichtrezeptor-PTPs in verschiedenen Cytoplasmapositionen sind, findet sich eine kleine Zahl dieser Enzyme im Nucleus (Flores et al., Mol. Cell. Biol. 14(7), 4938-46 [1994]). Viele Nichtrezeptor-PTPs scheinen sowohl als Aktivatoren als auch als Inhibitoren verschiedener Tyrosinphosphorylierter Proteine zu funktionieren. Eine Teilklasse scheint bei Hämopoese wichtige Rollen zu spielen. Beispielsweise wurde für die "mottenzerfressene" Maus, die den Phenotyp einer letalen Knochenmarkamplifikation und -entzündung aufweist, ermittelt, dass sie eine Mutation im PTP 1C-Gen aufweist (Schulz et al., Cell 73(7), 1445-54 [1993]); (McCulloch und Siminovitch, Adv. Exp. Med. Biol. 365, 145-54 [1994]). Ferner scheint der Grad der Tyrosinphosphorylierung des EPO-Rezeptors sowie der Grad der Rezeptoraktivierung teilweise durch das PTP 1C-Enzym ebenfalls gesteuert zu sein (Klingmuller et al., Cell 80(5), 729-38 [1995]). Jedoch ist, obwohl diese Beispiele sowie andere die potentielle Bedeutung der PTPs hervorheben, sehr wenig im Hinblick auf die physiologische Bedeutung dieser Enzyme bekannt.

[0005] Yi et al. [1991] Blood 78(9), 2222-2228, beschreiben eine Nicht-PTP der Bezeichnung PTPTY42. Die WO01/13989 beschreibt Verfahren und Zusammensetzungen zur Behandlung von Malignomen unter Verwendung einer DNA-Sequenz mit Codierung für eine PTPase.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Wir stellten die Hypothese auf, dass ein Mechanismus, durch den der nicht-differenzierte Zustand der Stammzelle aufrechterhalten werden kann, über die Dephosphorylierung von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen durch PTPs erfolgt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, analysierten wir eine große Zahl von PTPs von einer sehr primitiven embryonalen hämopoetischen Zellpopulation unter Verwendung von Consensus-PCR. Aus dieser Population klonierten wir eine neue intrazelluläre PTP, die viele der Eigenschaften, einschließlich einer Herrunterregulation des Transkripts, wenn die hämopoetischen Stammzellen differenzieren, aufweist, die von einer PTP, die an der Kontrolle von Differenzierungssignalen, die beispielsweise durch hämopoetische Wachstumsfaktoren induziert werden, beteiligt ist, erwartet werden sollten. Wir bezeichneten diese neue PTP als die "PTP hämopoetischer Stammzellen", die im Folgenden als "PTP-HSC" bezeichnet wird.

[0007] Daher betrifft die vorliegende Erfindung eine isolierte Nichtrezeptor-Proteintyrosinphosphatase von hämopoetischen Stammzellen (PTP-HSC) gemäß der Definition in Anspruch 1 oder Anspruch 6.

[0008] Die PTP-HSC

(1) wird vorherrschend in frühen hämopoetischen Stamm/Vorläuferzellen exprimiert;

(2) wird in Erwachsenengeweben vorwiegend nicht exprimiert;

(3) umfasst eine N-terminale Tyrosinphosphatasedomäne und anschließend an Serin, Threonin und Prolin reiche Region und eine carboxyterminale Region von etwa 15 bis 25 Aminosäuren, die an basischen Aminosäureresten reich ist; und

(4) ist zur Tyrosindephosphorylierung in hämopoetischen Stammzellen oder Vorläuferzellen fähig.

[0009] Diese neue PTP regelt vorzugsweise die STAT-Aktivierung herunter. Eine bevorzugte Gruppe der PTP-HSC-Proteine der vorliegenden Erfindung umfasst eine Protein, das die in **Fig.** 1 gezeigte Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) umfasst; ein Protein, das die in **Fig.** 8 gezeigte Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 17) umfasst, ein weiteres Säugerhomologon von einem der beiden Proteine gemäß der Definition in Anspruch 6 und Derivate der im Vorhergehenden genannten Proteine, die die Fähigkeit der Tyrosindephosphorylierung in hämopoetischen Stammzellen oder Vorläuferzellen beibehalten.

[0010] Die PTP-HSCs einschließlich von Derivaten (beispielsweise Aminosäuresequenzvarianten) der nativen Proteine weisen vorzugsweise eine aktive N-terminale Tyrosinphosphatasedomäne, die einen Serinrest an einer der Aminosäureposition 37 in **Fig.** 1 entsprechenden Position beibehält und einen Cysteinrest des aktiven Zentrums an einer der Aminosäureposition 229 in **Fig.** 1 entsprechenden Position beibehält, eine an Serin, Threonin und Prolin reiche Region und eine carboxyterminale Region, die mindestens etwa 80 % Sequenzhomologie mit der Aminosäuresequenz zwischen den Positionen 430 und 451 in **Fig.** 1 zeigt, auf. Vorzugswei-

se besitzen derartige Derivate mindestens etwa 65 % insgesamt Sequenzhomologie mit der in **Fig.** 1 oder **Fig.** 8 gezeigten Aminosäuresequenz und sie behalten die Fähigkeit zur Tyrosindephosphorylierung in hämopoetischen Stammzellen oder Vorläuferzellen bei.

[0011] In einem weiteren Aspekt sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung Agonisten und Antagonisten von PTP-HSCs.

[0012] In einem weiteren Aspekt sind Gegenstand der Erfindung isolierte Nucleinsäuremoleküle mit Codierung für die PTP-HSCs in dieser Beschreibung.

[0013] Gegenstand der Erfindung sind in einem weiteren Aspekt Vektoren, die Nucleinsäure mit Codierung für die PTP-HSCs dieser Beschreibung umfassen, die funktional mit Kontrollsequenzen, die von einer mit dem Vektor transformierten Wirtszelle erkannt werden, verknüpft sind, und mit derartigen Vektoren transformierte Zellen.

[0014] In einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Antikörper, die zur spezifischen Bindung an die PTP-HSCs dieser Erfindung fähig sind, und derartige Antikörper produzierende Hybridomzelllinien bereitgestellt. Die Antikörper können Agonistantikörper, die die Fähigkeit der nativen PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung zur Dephosphorylierung von Tyrosinen stimulieren, oder Antagonistantikörper, die diese Aktivität blockieren, sein.

[0015] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Assay zur Identifizierung eines Antagonisten oder Agonisten einer PTP-HSC der vorliegenden Erfindung, der das Inkontaktbringen der Phosphatasedomäne der PTP-HSC mit einem Antagonist- oder Agonistkandidaten und die Überwachung der Fähigkeit der Phosphatasedomäne zur Dephosphorylierung von Tyrosinresten umfasst.

[0016] Wir stellen ein Assay bzw. einen Test zur Identifizierung eines Antagonisten oder Agonisten einer PTP-HSC der vorliegenden Erfindung durch Kultivieren einer PTP-HSC exprimierenden hämopoetischen Stammzelllinie oder Vorläuferzelllinie in Gegenwart eines Antagonist- oder Agonistkandidaten und Überwachen der Differenzierung der Vorläuferzellen bereit.

[0017] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Differenzierung von nicht-differenzierten malignen hämopoetischen (beispielsweise Leukämie) Zellen in Zellkultur, das das Inkontaktbringen der Zellen mit einem Antagonistantikörper einer PTP-HSC der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0018] Gegenstand der Erfindung ist in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Induktion der Differenzierung einer hämopoetischen Stammzelle in Zellkultur, das das Inkontaktbringen der Stammzellen mit einem Antagonistantikörper einer PTP-HSC der vorliegenden Erfindung umfasst.

[0019] Gegenstand der Erfindung ist in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Expansion nicht-differenzierter hämopoetischer Stammzellen in Zellkultur, das das Kultivieren von Stammzellen in Gegenwart einer PTP-HSC der vorliegenden Erfindung oder eines spezifisch an natives PTP-HSC bindenden Agonistantikörpers umfasst.

[0020] Gegenstand der Erfindung ist in einem noch weiteren Aspekt die Herstellung eines Medikaments zur beispielsweise Expansion nicht-differenzierter Stammzellen in vivo, wobei in einem Beispiel das Medikament zur Verabreichung eines Agonistantikörpers von PTP-HSC der vorliegenden Erfindung und eines Stammzellwachstumsfaktors an einen Patienten dient.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0021] **Fig.** 1. DNA- und abgeleitete Proteinsequenz der murinen PTP-HSC-cDNA.

[0022] Angegeben ist die DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 1) und abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID NO: 2) der murinen PTP-HSC-cDNA. Die überstrichene Region ist die zu Phosphatase homologe Domäne. Das Sternchen bezeichnet den Cysteinrest des aktiven Zentrums. Die P, S, T-reiche Region ist durch Kästen um diese Reste erläutert. Die schraffierte carboxyterminale Region ist zu einem nukleären Lokalisierungssignal, das auf muriner PTP PEP gefunden wurde (Flores et al., Mol. Cell. Biol. 14(7), 4938-46 [1994], homolog.

[0023] **Fig.** 2. Sequenzhomologien von muriner PTP-HSC, muriner PTP PEP und humaner PTP PEST.

A. Die Phosphatasedomänehomologien zeigen, dass diese drei Proteine stark miteinander verwandt sind. Ein Stern über dem Rest (Aminosäure 37 von PTP-HSC) erläutert ein konserviertes Serin, das durch die Proteinkinasen A und C phosphoryliert wird und die PTPase-Aktivität negativ zu regulieren scheint (Garton und Tonks, EMBO J. 13(16), 3763-71 [1994]). Die Aminosäuresequenz der Positionen 24 – 301 von PTP PEP ist in SEQ ID NO: 18 gezeigt; die Aminosäuresequenz der Positionen 24 – 299 von PTP PEST ist in SEQ ID NO: 19 gezeigt.

B. Eine zweite stark homologe Region befindet sich am Carboxyterminus dieser drei Proteine (SEQ ID NO: 22, die die Aminosäuren 783 – 803 von PTP PEP zeigt; SEQ ID NO: 23, die die Aminosäuren 761 – 781 von PTP PEST zeigt). Es wurde gezeigt, dass diese Region der PTP PEP nukleäre Lokalisierung verleiht. Interessanterweise ist PTP PEST im Cytoplasma lokalisiert und es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dies auf den durch die Pfeile angegebenen zwei negativ geladenen Resten beruht. Wie ersichtlich ist, enthält PTP-HSC ebenfalls diese negativ geladenen Reste, was nahelegt, dass es ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert ist.

[0024] Fig. 3. Die PTP-PST-Familie.

[0025] Erläutert sind die drei bisher identifizierten Mitglieder dieser Familie einschließlich des derzeit beschriebenen neuen PTP (PTP-HSC). Gezeigt sind die aminoterminalen PTP-Domänen (schwarz), die P, S, T-reichen Domänen und die (schraffierte) carboxyterminale Homologie der nukleären Lokalisierung.

[0026] Fig. 4. Über die PTP-HSC-Domänenstruktur gelegte Intronstellen.

[0027] Eine Analyse des Gens mit Codierung für PTP-HSC zeigte die Lokalisierung von 14 Introns, die als Dreiecke in dieser Figur gezeigt sind.

[0028] Fig. 5. In-vitro-Tyrosinphosphataseaktivität der PTP-HSC.

[0029] Gezeigt ist die enzymatische Aktivität, die unter Verwendung der isolierten, durch Bakterien produzierten GST-Phosphatasedomäne von PTP-HSC erhalten wird. Volle Quadrate, Reihenverdünnungen von GST-PTP-HSC in Abwesenheit von Orthovanadat; leere Quadrate, enzymatische Aktivität von GST-PTP-HSC in Gegenwart von Vanadat; voller Kreis, enzymatische Aktivität von GST allein; leere Kreise, enzymatische Aktivität mit einer inaktiven GST-PTP (J. Cheng und L. Lasky – unveröffentlichte Daten). Das anfängliche unverdünnte Reaktionsgemisch enthielt 2 µg jedes Proteins.

[0030] **Fig.** 6. PCR-Analyse der PTP-HSC-Expression.

A. $lin^{lo}CD34^{hi}sca^{hi}$- oder $lin^{lo}CD34^{hi}sca^{lo}$- hämopoetische-Vorläuferzellen wurden am Tag 11 der Entwicklung aus Mäuseembryos isoliert. Die RNA wurde durch quantitative PCR isoliert und analysiert. Die obere Bande entspricht dem PTP-HSC-Transkript, während die untere Bande dem internen Standard von Triosephosphatisomerase (TPI) entspricht.

B. $lin^{lo}CD34^{hi}sca^{hi}$- hämopoetische Vorläufer/Stammzellen wurden aus muriner fetaler Leber gereinigt und bis zu 14 Tage in IL-s, IL-s, EPO und GM-CSF inkubiert. RNA wurde an verschiedenen Zeitpunkten isoliert und durch quantitative PCR wie in A beschrieben analysiert.

[0031] **Fig.** 7. PTP-HSC-Transkriptanalyse in embryonalen und Erwachsenengeweben und hämopoetischen Zelllinien.

A. Erläutert ist ein Gewebe-Northern-Blot, der mit einer cDNA mit Codierung für PTP-HSC sondiert wurde. Das linke Panel erläutert RNA, die aus Embryos verschiedenen Alters isoliert wurde, während das rechte Panel RNA erläutert, die aus a. Herz, b. Hirn, c. Milz, d. Lunge, e. Leber, f. Skelettmuskulatur, g. Niere, h. Hoden isoliert wurde.

B. Erläutert ist ein Northern-Blot von RNA, die aus BAF 3-(a), 32D- (b) und FDCP- (c) hämopoetischen-Vorläuferzellen isoliert wurde. Ebenfalls gezeigt ist die Ethidiumanfärbung des gleichen Gels vor der Übertragung.

C. PCR-Analyse von RNA, die aus BAF 3- (a), 32D- (b), T-Zellklon (c), FDCP (d), 11 Tage alten Embryos (e) und einer Kontrolle ohne reverse Transkriptase (f) isoliert wurde.

[0032] **Fig.** 8. Partielle DNA- und abgeleitete Proteinsequenz der humanen PTP-HSC-cDNA.

[0033] Erläutert ist die partielle DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 17) und abgeleitete Proteinsequenz (SEQ ID NO: 18) der humanen PTP-HSC-cDNA.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

A. Definitionen

[0034] Die Ausdrücke "Nichtrezeptor-Proteintyrosinphosphatase von hämopoetischen Stammzellen", "Tyrosinphosphatase von hämopoetischen Stammzellen" und "PTP-HSC" werden austauschbar verwendet und bezeichnen eine native intrazelluläre Proteintyrosinphosphatase, die (1) vorherrschend in frühen hämopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird, (2) vorherrschend in Erwachsenengeweben nicht exprimiert wird, (3) eine N-terminale Tyrosinphosphatasedomäne, eine anschließende an Serin, Threonin und Prolin reiche Region und eine an basischen Aminosäureresten reiche carboxyterminale Region von etwa 15 bis 25 Aminosäuren umfasst, und (4) zur Tyrosindephosphorylierung in hämopoetischen Vorläuferzellen fähig ist, und funktionale Derivate einer derartigen nativen Tyrosinphosphatase.

[0035] Der Ausdruck "native Tyrosinphosphatase" bezeichnet in diesem Kontext eine natürlich vorkommende Tyrosinphosphatase mit den beschriebenen Eigenschaften einer beliebigen humanen oder nicht-humanen Lebewesenart mit dem oder dem initiierenden Methionin, ungeachtet dessen, ob gereinigt oder von einer nativen Quelle, synthetisiert, durch Gentechnologie oder eine beliebige Kombination dieser und/oder anderer Verfahren produziert. Native PTP-HSCs umfassen speziell die nativen murinen und nativen humanen HSC-Proteine (SEQ ID NO: 2 bzw.).

[0036] Ein "funktionales Derivat" eines Polypeptids ist eine Verbindung mit der qualitativ gleichen biologischen Aktivität wie das native Polypeptid. Daher ist ein funktionales Derivat eines nativen PTP-HSC-Polypeptids eine Verbindung, die die gleiche qualitative biologische Aktivität wie eine native PTP-HSC hat. "Funktionale Derivate" umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, Fragmente nativer Polypeptide von einer beliebigen Lebewesenart (einschließlich Menschen), Derivate nativer (humaner und nicht-humaner) Polypeptide und von deren Fragmenten und Peptid- und Nichtpeptidanaloga nativer Polypeptide, vorausgesetzt sie weisen die gleiche biologische Aktivität wie ein jeweiliges natives Polypeptid auf. "Fragmente" umfassen Regionen innerhalb der Sequenz eines reifen nativen Polypeptids. Der Ausdruck "Derivat" wird zur Definition von Aminosäuresequenzvarianten und covalenten Modifikationen eines nativen Polypeptids verwendet.

[0037] "Nichtpeptidanaloga" sind organische Verbindungen, die im Wesentlichen die gleiche Oberfläche wie Peptidanaloga der nativen Polypeptide zeigen. Daher sind die Nichtpeptidanaloga der nativen PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung organische Verbindungen, die im Wesentlichen die gleiche Oberfläche wie Peptidanaloga der nativen PTP-HSCs zeigen. Derartige Verbindungen wechselwirken mit anderen Molekülen in einer ähnlichen Weise wie die Peptidanaloga und sie ahmen die biologische Aktivität einer nativen PTP-HSC der vorliegenden Erfindung nach. Die Polypeptid-funktionalen-Derivate der nativen PTP-HSC der vorliegenden Erfindung weisen vorzugsweise eine aktive N-terminale Tyrosinphosphatasedomäne, die einen Serinrest an einer der Aminosäureposition 37 in **Fig.** 1 entsprechenden Position beibehält und einen Cysteinrest eines aktiven Zentrums an einer der Aminosäureposition 229 in **Fig.** 1 entsprechenden Position beibehält; eine an Serin, Threonin und Prolin reiche Region; und eine carboxyterminale Region, die mindestens 80 % Sequenzhomologie mit der Aminosäuresequenz zwischen den Positionen 430 und 451 in **Fig.** 1 zeigt, auf. Vorzugsweise besitzen derartige Derivate mindestens etwa 65 %, günstigerweise mindestens etwa 75 %, noch besser mindestens etwa 85 %, am günstigsten mindestens etwa 95 % insgesamt Sequenzhomologie mit der in **Fig.** 1 gezeigten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) oder **Fig.** 8 gezeigten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 18) auf und sie behalten die Fähigkeit der Tyrosindephosphorylierung in hämopoetischen Vorläuferzellen bei.

[0038] Der Ausdruck "biologische Aktivität" ist im Kontext der Definition funktionaler Derivate als der Besitz von mindestens einer mit einem nativen Polypeptid (beispielsweise PTP-HSC) qualitativ gemeinsamen adhäsiven, regulatorischen oder Effektorfunktion definiert. Die funktionalen Derivate der nativen PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung werden durch deren qualitative Fähigkeit zur Tyrosindephosphorylierung in hämopoetischen Vorläuferzellen vereinigt. Ferner sind die funktionalen Derivate der nativen PTP-HSCs dieser Beschreibung vorzugsweise zur Herunterregulierung der STAT-Aktivierung fähig.

[0039] Der Ausdruck "Agonist" wird zur Bezeichnung von Peptid- und Nichtpeptidanaloga der nativen PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung und von Antikörpern, die spezifisch an derartige native PTP-HSCs binden, vorausgesetzt sie behalten die qualitative Fähigkeit der Tyrosindephosphorylierung in hämopoetischen Vorläuferzellen bei, verwendet.

[0040] Der Ausdruck "Antagonist" wird zur Bezeichnung eines Moleküls, das die Fähigkeit einer PTP-HSC der vorliegenden Erfindung zur Dephosphorylierung von Tyrosinen hemmt, verwendet. Bevorzugte Antagonisten

blockieren eine durch eine PTP-HSC verursachte Tyrosindephosphorylierung im Wesentlichen vollständig.

[0041] "Identität" oder "Homologie" in Bezug auf ein natives Polypeptid und dessen funktionales Derivat ist hier als der Prozentsatz an Aminosäureresten in der Kandidatensequenz, die mit Resten eines entsprechenden nativen Polypeptids nach dem Aligning der Sequenzen und gegebenenfalls der Einführung von Lücken, um eine maximale prozentuale Homologie zu erreichen und ohne Berücksichtigung etwaiger konservativer Substitutionen als Teil der Sequenzidentität identisch sind, definiert. Weder N- oder C-terminale Verlängerungen noch Insertionen sollen als die Identität oder Homologie verringernd betrachtet werden. Verfahren und Computerprogramme für das Alignment sind einschlägig bekannt.

[0042] Der Ausdruck "Stammzelle" wird im breitesten Sinne zur Beschreibung von Zellen, die nicht terminal differenziert sind und die Fähigkeit zur Teilung während der gesamten Lebensdauer des Organismus aufweisen, die Nachkommen, die differenzieren, und andere, die Stammzellen bleiben, ergeben, verwendet, wobei Stammzellen jedes Gewebetyps, wie die Darmauskleidung, die Epidermisschicht der Haut und die blutbildenden Gewebe, umfasst werden.

[0043] Der Ausdruck "hämopoetische Stammzelle" wird im breitesten Sinne verwendet, wobei er Stammzellen, von denen Blutzellen abstammen, einschließlich pluripotenter Stammzellen, Lymph- und Knochenmarkstammzellen bezeichnet.

[0044] Der Ausdruck "hämopoetische Vorläuferzelle" bezeichnet die Nachkommen einer pluripotenten hämopoetischen Stammzelle, die auf eine spezielle Differenzierungslinie festgelegt sind. Diese festgelegten Vorläuferzellen sind irreversibel als Vorfahren von nur einer oder wenigen Blutzellarten, beispielsweise Erythrocyten oder Granulocyten, bestimmt.

[0045] "Hämopoetische Wachstumsfaktoren" sind Wachstumsfaktoren, wie die Blutzellbildung oder -differenzierung in vivo beeinflussen, beispielsweise EPO, TPO, IL-3, IL-6, Stammzellwachstumsfaktor, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, FTL 3-Ligand, LIF und dergleichen, die durch ihre Rolle der Vermittlung von Proteinphosphorylierung vereinigt sind. Die Rezeptoren dieser Wachstumsfaktoren sind entweder Transmembrantyrosinkinasen oder Mitglieder der Cytokinrezeptorfamilie.

[0046] Üblicherweise bezeichnen die Ausdrücke "Aminosäure" und "Aminosäuren" alle natürlich vorkommenden L-α-Aminosäuren. In einigen Ausführungsformen können jedoch D-Aminosäuren in den Polypeptiden oder Peptiden der vorliegenden Erfindung vorhanden sein, um eine Konformationsbeschränkung zu ermöglichen. Beispielsweise kann eine D-Aminosäure Cystein an einem oder beiden Enden eines funktionalen Peptidderivats oder Peptidantagonisten der nativen PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung angebracht sein, um die Bildung und Stabilität einer Disulfidbindung zu ermöglichen. Die Aminosäuren werden durch entweder die Einbuchstaben- oder Dreibuchstabenbezeichnungen identifiziert:

Asp	D	Asparaginsäure	Ile	I	Isoleucin
Thr	T	Threonin	Leu	L	Leucin
Ser	S	Serin	Tyr	Y	Tyrosin
Glu	E	Glutaminsäure	Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin	His	H	Histidin
Gly	G	Glycin	Lys	K	Lysin
Ala	A	Alanin	Arg	R	Arginin
Cys	C	Cystein	Trp	W	Tryptophan
Val	V	Valin	Gln	Q	Glutamin
Met	M	Methionin	Asn	N	Asparagin

[0047] Diese Aminosäuren können nach der chemischen Zusammensetzung und Eigenschaften ihrer Seitenketten klassifiziert werden. Sie werden grob in zwei Gruppen, geladene und ungeladene, klassifiziert. Jede dieser Gruppen wird in Untergruppen unterteilt, um die Aminosäuren genauer zu klassifizieren:

I. Geladene Aminosäuren

Saure Reste: Asparginsäure, Glutaminsäure

Basische Reste: Lysin, Arginin, Histidin

II. Ungeladene Aminosäuren:

Hydrophile Reste: Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin
Aliphatische Reste: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin
Unpolare Reste: Cystein, Methionin, Prolin
Aromatische Reste: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan

[0048] Der Ausdruck "Aminosäuresequenzvariante" bezeichnet Moleküle mit einigen Unterschieden in deren Aminosäuresequenzen im Vergleich zu einer nativen Aminosäuresequenz.

[0049] Substitutionsvarianten sind diejenigen, bei denen mindestens ein Aminosäurerest in einer nativen Sequenz entfernt und eine unterschiedliche Aminosäure an deren Stelle an der gleichen Position eingeführt wurde. Die Substitutionen können einzeln sein, wobei nur eine Aminosäure in dem Molekül substituiert wurde, oder sie können mehrfache sein, wobei zwei oder mehrere Aminosäuren in dem gleichen Molekül substituiert wurden.

[0050] Insertionsvarianten sind diejenigen, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren unmittelbar angrenzend an eine Aminosäure an einer speziellen Position in einer nativen Sequenz insertiert wurden. Unmittelbar angrenzend an eine Aminosäure bedeutet mit entweder der funktionalen α-Carboxy- oder α-Aminogruppe der Aminosäure verbunden.

[0051] Deletionsvarianten sind diejenigen, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren in der nativen Aminosäuresequenz entfernt sind. Üblicherweise sind bei Deletionsvarianten eine oder zwei Aminosäuren in einer speziellen Region des Moleküls deletiert.

[0052] "Antikörper (Abs)" und "Immunglobuline (Igs)" sind Glycoproteine mit den gleichen Struktureigenschaften. Während Antikörper Bindungsspezifität zu einem speziellen Antigen zeigen, umfassen Immunglobuline sowohl Antikörper als auch andere antikörperähnliche Moleküle, denen Antigenspezifität fehlt. Polypeptide der letzteren Art werden beispielsweise in niedrigen Konzentrationen durch das Lymphsystem und in erhöhten Konzentrationen durch Myelome produziert.

[0053] Native Antikörper und Immunglobuline sind üblicherweise heterotetramere Glycoproteine von etwa 150000 Dalton, die aus zwei identischen leichten (L) Ketten und zwei identischen schweren (H) Ketten bestehen. Jede leichte Kette ist durch eine kovalente Disulfidbindung mit einer schweren Kette verbunden, während die Zahl der Disulfidverknüpfungen zwischen den schweren Ketten verschiedener Immunglobulinisotypen variiert. Jede schwere und leichte Kette besitzt ferner regelmäßig beabstandete Intrakettendisulfidbrücken. Jede schwere Kette besitzt an einem Ende eine variable Domäne (V_H) und anschließend eine Zahl konstanter Domänen. Jede leichte Kette besitzt eine variable Domäne an einem Ende (V_L) und eine konstante Domäne an deren anderem Ende; die konstante Domäne der leichten Kette ist mit der ersten konstanten Domäne der schweren Kette aligniert und die variablen Domäne der leichten Kette ist mit der variablen Domäne der schweren Kette aliginiert. Von speziellen Aminosäuren wird angenommen, dass sie eine Grenzfläche zwischen den variablen Domänen der leichten und schweren Kette bilden (Clothia et al., J. Mol. Biol. 186, 651-663 [1985]; Novotny und Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4592-4596 [1985]).

[0054] Der Ausdruck "variabel" bezeichnet die Tatsache, dass bestimmte Teile der variablen Domänen sich unter Antikörpern hinsichtlich der Sequenz stark unterscheiden und bei der Bindung und Spezifität jedes speziellen Antikörpers für dessen spezielles Antigen verwendet werden. Jedoch ist die Variabilität über die variablen Domänen von Antikörpern nicht gleichmäßig verteilt. Sie konzentriert sich in drei Segmenten, die als komplimentaritätsbestimmende Regionen (CDRs) oder hypervariable Regionen bezeichnet werden, in den variablen Domänen sowohl der leichten Kette als auch der schweren Kette. Die stärker konservierten Teile variabler Domänen werden als das Gerüst (FR) bezeichnet. Die variablen Domänen von nativen schweren und leichten Ketten umfassen jeweils vier FR-Regionen, die in großem Umfang eine β-Faltblattkonfiguration annehmen, die durch drei CDRs verbunden sind, die Schleifen bilden, die die β-Faltblattstruktur verbinden und in einigen Fällen einen Teil derselben bilden. Die CDRs in jeder Kette werden durch die FR-Regionen in enger Nähe gehalten und sie tragen mit den CDRs von der anderen Kette zur Bildung der Antigenbindungsstelle von Antikörpern bei (siehe E. A. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD [1991]). Die konstanten Domänen sind an der Bindung eines Antikörpers an ein Antigen nicht direkt beteiligt, zeigen jedoch verschiedene Effektorfunktionen, wie die Beteiligung des Antikörpers an antikörperabhängiger Zelltoxizität.

[0055] Papainverdau von Antikörpern produziert zwei identische Antigenbindungsfragmente, die als Fab-Fragmente bezeichnet werden, jeweils mit einer einzigen Antigenbindungsstelle, und ein verbliebenes

"Fc"-Fragment, dessen Name dessen Fähigkeit, leicht zu kristallisieren, reflektiert. Eine Pepsinbehandlung ergibt ein $F(ab')_2$-Fragment, das zwei Antigenkombinationsstellen aufweist und Antigen immer noch vernetzen kann.

[0056] "Fv" ist das minimale Antikörperfragment, das eine vollständige Antigenerkennungs- und -bindungsstelle enthält. Diese Region besteht aus einem Dimer aus einer variablen Domäne einer schweren Kette und einer leichten Kette in fester, nicht-kovalenter Verbindung. Genau in dieser Konfiguration wirken die drei CDRs jeder variablen Domäne zusammen unter Festlegung einer Antigenbindungsstelle auf der Oberfläche des V_H-V_L-Dimers. Kollektiv verleihen die sechs CDRs dem Antikörper Antigenbindungsspezifität. Jedoch besitzt auch eine einzige variable Domäne (oder die Hälfte eines Fv, die nur drei für ein Antigen spezifische CDRs umfasst) die Fähigkeit zur Erkennung und Bindung eines Antigens, wenngleich mit geringerer Affinität als die gesamte Bindungsstelle.

[0057] Das Fab-Fragment enthält auch die konstante Domäne der leichten Kette und die erste konstante Domäne (CH1) der schweren Kette. Fab'-Fragmente unterscheiden sich von Fab-Fragmenten durch die Addition von einigen wenigen Resten am Carboxyterminus der CH1-Domäne der schweren Kette, die ein oder mehrere Cysteine von der Antikörpergelenkregion umfassen. Fab'-SH ist hier die Bezeichnung für Fab', wobei der Cysteinrest bzw. die Cysteinreste der konstanten Domänen eine freie Thiolgruppe tragen. $F(ab')_2$-Antikörperfragmente wurden ursprünglich als Paare von Fab'-Fragmenten, die zwischen diesen Gelenkcysteine aufweisen, produziert. Andere, chemische Kopplungen von Antikörperfragmenten sind ebenfalls bekannt.

[0058] Die leichten Ketten von Antikörpern (Immunglobuline) einer Wirbeltierart können einer von zwei klar unterschiedlichen Arten der Bezeichnung kappa und lambda (λ) auf der Basis der Aminosäuresequenzen ihrer konstanten Domänen zugeordnet werden.

[0059] In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz der konstanten Domäne ihrer schweren Ketten können Immunglobuline verschiedenen Klassen zugeordnet werden. Es gibt fünf Hauptklassen der Immunglobuline: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, und mehrere von diesen können weiter in Unterklassen (Isotypen) unterteilt werden, beispielsweise IgG-1, IgG-2, IgG-3 und IgG-4; IgA-1 und IgA-2. Die konstanten Domänen der schweren Kette, die den verschiedenen Immunglobulinklassen entsprechen, werden als α, δ, ε, γ bzw. μ bezeichnet. Die Strukturen der Untereinheiten und dreidimensionalen Konfigurationen verschiedener Immunglobulinklassen sind bekannt.

[0060] Der Ausdruck "Antikörper" wird im breitesten Sinne verwendet und umfasst speziell einzelne monoklonale Antikörper (die Agonisten- und Antagonistenantikörper umfassen), Antikörperzusammensetzungen mit Polyepitopspezifität sowie Antikörperfragmente (beispielsweise Fab, $F(ab')_2$ und Fv), sofern sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen.

[0061] Der hier verwendete Ausdruck "monoklonaler Antikörper" bezeichnet einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern erhalten wurde, d. h. die individuellen, die Population umfassenden Antikörper sind mit Ausnahme dessen identisch, dass mögliche natürlich vorkommende Mutationen in geringen Mengen vorhanden sein können. Monoklonale Antikörper sind hochspezifisch, wobei sie gegen eine einzige Antigenstelle gerichtet sind. Ferner ist im Gegensatz zu herkömmlichen (polyklonalen) Antikörperpräparaten, die typischerweise unterschiedliche Antikörper, die gegen unterschiedliche Determinanten (Epitope) gerichtet sind, umfassen, jeder monoklonale Antikörper gegen eine einzige Determinante an dem Antigen gerichtet. Zusätzlich zu ihrer Spezifität sind die monoklonalen Antikörper insofern vorteilhaft, als sie durch die Hydridomkultur nichtkontaminiert durch andere Immunoglobuline synthetisiert werden. Die Modifizierung "monoklonal" gibt den Charakter des Antikörpers, dass er aus einer im Wesentlichen homologen Antikörperpopulation erhalten wurde, an und soll nicht bedeuten, dass die Produktion des Antikörpers durch ein spezielles Verfahren erforderlich ist. Beispielsweise können die gemäß der vorliegenden Erfindung zu verwendenden monoklonalen Antikörper durch das von Kohler & Milstein, Nature 256:495 (1975), als erstes beschriebene Hybridomverfahren hergestellt werden oder durch gentechnische Verfahren hergestellt werden [siehe beispielsweise US-Patent 4 816 567 (Cabilly et al.)].

[0062] Die monoklonalen Antikörper umfassen hier und im Folgenden speziell "chimäre" Antikörper (Immunglobuline), in denen ein Teil der schweren und/oder leichten Kette identisch mit oder homolog zu entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die von einer speziellen Art abgeleitet sind oder zu einer speziellen Antikörperklasse oder -subklasse gehören, ist, während der Rest der Kette(n) identisch mit oder homolog zu entsprechenden Sequenzen in Antikörpern, die von einer anderen Art abgeleitet sind oder zu einer anderen Antikörperklasse oder -subklasse gehören, ist, sowie Fragmente derartiger Antikörper, sofern sie die gewünschte bi-

ologische Aktivität zeigen (US-Patent 4 816 567 (Cabilly et al., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855 [1984)].

[0063] "Humanisierte" Formen nicht-humaner (beispielsweise muriner) Antikörper sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente derselben (wie Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ oder andere antigenbindendes Teilsequenzen von Antikörpern), die eine minimale Sequenz, die von nicht-humanem Immunglobulin abgeleitet ist, enthalten. Zum größten Teil sind humanisierte Antikörper humane Immunglobuline (Empfängerantikörper), in denen Reste einer komplimentaritätsbestimmenden Region (CDR) des Empfängers durch Reste von einer CDR einer nicht-humanen Art (Spenderantikörper), wie Maus, Ratte oder Kaninchen, mit der gewünschten Spezifität, Affinität und Kapazität ersetzt sind. In einigen Fällen sind Fv-Gerüstreste des humanen Immunglobulins durch entsprechende nicht-humane Reste ersetzt. Ferner kann ein humanisierter Antikörper Reste umfassen, die weder im Empfängerantikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüstsequenzen gefunden werden. Diese Modifikationen werden zur weiteren Verfeinerung und Optimierung von Antikörpereigenschaften durchgeführt. Allgemein umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von mindestens einer und typischerweise zwei variablen Domänen, in denen alle oder im Wesentlichen alle CDR-Regionen denen eines nicht-humanen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle FR-Regionen die einer humanen Immunglobulin-Konsensussequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst ferner optimal mindestens einen Teil einer konstanten Region eines Immunglobulins (Fc), typischerweise der eines humanen Immunglobulins. Für weitere Einzelheiten siehe:
Jones et al., Nature 321, 522-525 [1986]; Reichmann et al., Nature 332, 323-329 [1988]; EP-B-239 400, veröffentlicht am 30. September 1987; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 593-596 [1992]; und EP-B-451 216, veröffentlicht am 24. Januar 1996.

[0064] Im Kontext der vorliegenden Erfindung werden die Ausdrücke "Zelle", "Zelllinie" und "Zellkultur" austauschbar verwendet und alle derartigen Bezeichnungen umfassen die Nachkommen. Es ist auch klar, dass aufgrund geplanter oder unabwendbarer Mutationen alle Nachkommen nicht genau identisch bezüglich des DNA-Gehalts sein müssen. Mutante Nachkommen, die die gleiche Funktion oder biologische Eigenschaft, auf die die ursprünglich transformierte Zelle gescreent wurde, aufweisen, werden umfasst.

[0065] Die Ausdrücke "replizierbarer Expressionsvektor" und " Expressionsvektor" bezeichnen ein üblicherweise doppelsträngiges DNA-Stück, das ein Stück Fremd-DNA insertiert haben kann. Fremd-DNA ist als heterologe DNA, die in der Wirtszelle natürlicherweise nicht vorhandene DNA ist, definiert. Der Vektor wird zum Transport der Fremd-DNA oder heterologen DNA in eine geeignete Wirtszelle verwendet. Sobald er in der Wirtszelle ist, kann sich der Vektor unabhängig von der chromosomalen DNA des Wirts replizieren und mehrere Kopien des Vektors und von dessen insertierter (Fremd-)DNA können erzeugt werden. Zusätzlich enthält der Vektor die notwendigen Elemente, die die Translation der Fremd-DNA in ein Polypeptid ermöglichen. Viele Moleküle des durch Fremd-DNA codierten Polypeptids können auf diese Weise rasch synthetisiert werden.

[0066] "Oligonucleotide" sind einzel- oder doppelsträngige Polydesoxynucleotide geringer Länge, die durch bekannte Verfahren (beispielsweise Phosphotriester-, Phosphit- oder Phosporamiditchemie, unter Verwendung von Festphasentechniken, beispielsweise gemäß der Beschreibung in EP 266 032, veröffentlicht am 4. Mai 1988, oder über Desoxynucleosid-H-phosphanat-zwischenprodukte gemäß der Beschreibung bei Froehler et al., Nucl. Acids Res., 14, 5399 (1986)) chemisch synthetisiert werden. Sie werden dann auf Polyacrylamidgelen gereinigt.

B. Produktion von PTP-HSCs durch Gentechnologie

1. Identifizierung und Isolierung von Nucleinsäure mit Codierung für PTP-HSCs

[0067] Die nativen PTP-HSC-Proteine der vorliegenden Erfindung können aus relativ undifferenzierten frühen hämopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen isoliert werden. Die Isolierung von muriner PTP-HSC aus der $CD34^{hi}$-Fraktion von murinen 10,5 Tage alten Dottersack- oder Embryozellen wird in den Beispielen erläutert. In ähnlicher Weise kann murine PTP-HSC aus einer $CD34^{hi}$-Population, die aus Knochenmark oder fetaler Leber stammt, isoliert werden. Es wurde ermittelt, dass die Reinheit dieser murinen Zellen eine kritische Stufe bei der Isolierung der mRNA mit Codierung für die neue murine PTP-HSC der vorliegenden Erfindung war. Ein hoher Reinheitsgrad wurde durch Reinigung mit einem Kaninchen-Anti-Maus-CD34-Antikörper, eine anschließende Nachkommenabreicherungsstufe und eine positive Selektionsstufe mit dem Sca-Antikörper erreicht. Alternativ kann murine PTP-HSC aus anderen relativ undifferenzierten Vorläufern von reifen murinen hämopoetischen Zellen, wie BAF3-, 32D- und FDCP-hämopoetischen Vorläuferzellen, die von der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich sind, detektiert und erhalten werden. Native humane PTP-HSC kann bei-

spielsweise aus humanen CMK-Vorläuferzellen identifiziert und erhalten werden. Da die PTP-HSCs-Enzyme ein äußerst geringes Vorkommen in Embryogeweben zeigen, wäre deren Reinigung durch herkömmliche Verfahren sehr mühsam und ineffizient. Stattdessen können cDNA- oder Genomklone mit Codierung für die PTP-HSC-Proteine der vorliegenden Erfindung unter Verwendung von Standardtechniken der Gentechnik hergestellt werden. Beispielsweise kann eine cDNA-Bibliothek durch Gewinnung von polyadenylierter mRNA aus einer Zelllinie, von der bekannt ist, dass sie die gewünschte PTP-HSC exprimiert, und Verwendung der mRNA als Templat zur Synthese von doppelsträngiger cDNA konstruiert werden. Für diesen Zweck geeignete Beispiele für humane und nicht-humane Zelllinien sind im Vorhergehenden aufgelistet. Ein PTP-HSC-Polypeptid kann auch aus einer Genombibliothek, beispielsweise einer humanen genomischen Cosmidbibliothek, erhalten werden.

[0068] cDNA- oder Genom-Bibliotheken werden dann mit Sonden gescreent, die so gestaltet sind, dass sie das interessierende Gen oder das dadurch codierte Protein identifizieren. Für cDNA-Expressionsbibliotheken geeignete Sonden umfassen monoklonale und polyklonale Antikörper, die ein PTP-HSC-Polypeptid erkennen und spezifisch an dieses binden. Für cDNA-Bibliotheken geeignete Sonden umfassen sorgfältig ausgewählte Oligonucleotidsonden (üblicherweise einer Länge von etwa 20 – 80 Basen), die bekannte oder vermutete Teile eines PTP-HSC-Polypeptids der gleichen oder einer unterschiedlichen Art codieren, und/oder komplementäre oder homologe cDNAs oder Fragmente derselben, die das gleiche oder ein ähnliches Gen codieren. Passende Sonden zum Screening von Genom-DNA-Bibliotheken umfassen ohne Beschränkung Oligonucleotide, cDNAs oder Fragmente derselben, die das gleiche oder ein ähnliches Gen codieren, und/oder homologe Genom-DNAs oder Fragmente derselben. Das Screening der cDNA- oder Genombibliothek mit der ausgewählten Sonde kann unter Verwendung Standardverfahren gemäß der Beschreibung in den Kapiteln 10-12 von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 durchgeführt werden.

[0069] Wenn DNA mit Codierung für ein Enzym der vorliegenden Erfindung durch die Verwendung sorgfältig ausgewählter Oligonucleotidsequenzen zum Screening von cDNA-Bibliotheken von verschiedenen Geweben isoliert wird, sollten die als Sonden gewählten Oligonucleotidsequenzen von ausreichender Länge sein und ausreichend unzweideutig sein, damit falsche positive Ergebnisse minimiert sind. Die tatsächliche Nucleotidsequenz bzw. tatsächlichen Nucleotidsequenzen werden üblicherweise auf der Basis von Regionen, die die geringste Codonredundanz aufweisen, gestaltet. Die Oligonucleotide können an einer oder mehreren Positionen entartet sein. Die Verwendung entarteter Oligonucleotide ist von spezieller Bedeutung, wenn eine Bibliothek von einer Art, in der eine bevorzugte Codonverwendung unbekannt ist, gescreent wird.

[0070] Das Oligonucleotid muss derart markiert sein, dass es bei Hybridisierung an DNA in der gescreenten Bibliothek detektiert werden kann. Das bevorzugte Markierungsverfahren ist die Verwendung von ATP (beispielsweise $\gamma^{32}P$) und Polynucleotidkinase zur radioaktiven Markierung des 5'-Endes des Oligonucleotids. Jedoch können andere Verfahren zur Markierung des Oligonucleotids verwendet werden, die, ohne hierauf beschränkt zu sein, die Biotinylierung oder Enzymmarkierung umfassen.

[0071] cDNAs mit Codierung für PTP-HSCs können auch durch andere bekannte Techniken der Gentechnik, beispielsweise direkte Expressionsklonierung oder Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) gemäß der Beschreibung in US-Patent 4 683 195, erteilt am 28. Juli 1987, in Abschnitt 14 von Sambrook et al., aaO, oder in Kapitel 15 von Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Hrsg., Greene Publishing Associates und Wiley-Interscience 1991, identifiziert und isoliert werden. Die Verwendung der PCR-Technik zur Gewinnung von cDNA mit Codierung für murine PTP-HSC oder die PTP-Domäne dieses nativen Proteins ist auch in den Beispielen erläutert.

[0072] Sobald cDNA mit Codierung für ein PTP-HSC-Enzym von einer Art isoliert wurde, können cDNAs von anderen Arten ebenfalls durch Artenkreuzhybridisierung erhalten werden. Gemäß diesem Ansatz werden humane oder andere Säuger-cDNA- oder Geombibliotheken durch markierte Oligonucleotidsequenzen, die aus bekannten PTP-HSC-Sequenzen (wie murine PTP-HSC) gemäß bekannten Kriterien, darunter das Kriterium, dass die Sequenz von ausreichender Länge und ausreichend unzweideutig, dass falsche positive Ergebnisse minimiert sind, sein sollte, ausgewählt sind, sondiert. Typischerweise ist ein ^{32}P-markiertes Oligonucleotid mit etwa 30 bis 50 Basen ausreichend, insbesondere, wenn das Oligonucleotid ein oder mehrere Codons für Methionin oder Tryptophan enthält. Isolierte Nucleinsäure ist DNA, die identifiziert und von kontaminierender Nucleinsäure mit Codierung für andere Polypeptide aus der Nucleinsäurequelle abgetrennt ist. Hybridisierung wird vorzugsweise unter "stringenten Bedingungen" durchgeführt, was (1) die Verwendung von niedriger Ionenstärke und hoher Temperatur für das Waschen, beispielsweise 0,015 Natriumchlorid/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % Natriumdodecylsulfat bei 50 °C, oder (2) die Verwendung eines Denaturierungsmittel während der

Hybridisierung, beispielsweise Formamid, beispielsweise 50 % (V/V) Formamid mit 0,1 % Rinderserumalbumin/0,1 % Polyvinylpyrrolidon/50 nM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,5 mit 650 mM Natriumchlorid, 75 mM Natriumcitrat bei 42 °C bedeutet. Ein weiteres Beispiel ist die Verwendung von 5)% Formamid, 5 × SSC (0,75 M Natriumchlorid, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1 Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, ultraschallbehandelter Lachssperma-DNA (50 µg/ml), 0,1 % SDS und 10 Dextransulfat bei 42 °C mit Waschvorgängen bei 42 °C in 0,2 × SSC und 0,1 % SDS.

[0073] Sobald die Sequenz bekannt ist, kann das Gen mit Codierung für ein spezielles PTP-HSC-Polypeptid auch durch chemische Synthese nach einem der Verfahren gemäß der Beschreibung in Engels und Uhlmann, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 28, 716 (1989), erhalten werden. Diese Verfahren umfassen Triester-, Phosphit-, Phosphoramidit- und H-Phosponatverfahren, PCR- und andere Autoprimerverfahren und Oligonucleotidsynthesen an festen Trägern.

2. Klonierung und Expression von Nucleinsäure mit Codierung für PTP-HSCs

[0074] Sobald die Nucleinsäure mit Codierung für PTP-HSC zur Verfügung steht, wird sie allgemein in einen replizierbaren Expressionsvektor zur weiteren Klonierung (Amplifikation der DNA) oder zur Expression ligiert.

[0075] Expressions- und Klonierungsvektoren sind einschlägig bekannt und enthalten eine Nucleinsäuresequenz, die eine Replikation des Vektors in einer oder mehreren ausgewählten Wirtszellen ermöglicht. Die Auswahl des passenden Vektors ist abhängig von 1) der Frage, ob er zur DNA-Amplifikation oder zur DNA-Expression verwendet wird, 2) der Größe der in den Vektor zu insertierenden DNA und 3) der mit dem Vektor zu transformierenden Wirtszelle. Jeder Vektor enthält verschiedene Komponenten in Abhängigkeit von dessen Funktion (Amplifikation von DNA oder Expression von DNA) und der Wirtszelle, für die er kompatibel ist. Die Vektorkomponenten umfassen allgemein, ohne hierauf beschränkt zu sein, eine oder mehrere der folgenden Komponenten: eine Signalsequenz, einen Replikationsstartpunkt, ein oder mehrere Markergene, ein Enhancerelement, einen Promotor und eine Transkriptionsterminationssequenz. Die Konstruktion geeigneter Vektoren, die eine oder mehrere der oben aufgelisteten Komponenten, die gewünschten Codierungs- und Kontrollsequenzen enthalten, erfolgt unter Verwendung von Standardligationstechniken. Isolierte Plasmide oder DNA-Fragmente werden gespalten, maßgeschneidert und in der gewünschten Form religiert, um die erforderlichen Plasmide zu erzeugen. Zur Analyse zur Feststellung der korrekten Sequenzen in den konstruierten Plasmiden werden die Ligationsgemische üblicherweise zur Transformation von E. coli-Zellen, beispielsweise E. coli K 12-Stamm 294 (ATCC 31446), verwendet und erfolgreiche Transformanten gegebenenfalls durch Ampicillin- oder Tetracyclinresistenz selektiert. Plasmide ausgehend von den Transformanten werden nach dem Verfahren von Messing et al., Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981), oder dem Verfahren von Maxam et al., Methods in Enzymology 65, 499 (1980) hergestellt, durch Restriktionsendonucleaseverdau analysiert und/oder sequenziert.

[0076] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können in einer Vielzahl prokaryotischer und eukaryotischer Wirtszellen exprimiert werden. Geeignete Prokaryoten umfassen gramnegative oder grampositive Organismen, beispielsweise E. coli oder Bacilli. Ein bevorzugter Klonierungswirt ist E. coli 294 (ATCC 31446), obwohl andere gramnegative oder grampositive Prokaryoten, wie E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31537), E. coli W3110 (ATCC 27325), Pseudomonas-Arten oder Serratia Marcesans, geeignet sind.

[0077] Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroben, wie Fadenpilze oder Hefe, hierbei geeignete Wirte für Vektoren. Saccharomyces cerevisiae oder Bäckerhefe ist der am häufigsten verwendete von niederen eukaryotischen Wirtsorganismen. Jedoch sind eine Zahl anderer Gattungen, Arten und Stämme hierbei üblicherweise verfügbar und verwendbar, beispielsweise S. pombe [Beach and Nurse, Nature 290, 140 (1981)], Kluyveromyces lactis [Louvencourt et al., J. Bacteriol. 737 (1983)], Yarrowia (EP 402226), Pichia pastoris (EP 183070), Trichoderma reesia (EP 244234), Neurospora crassa [Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76, 5259-5263 (1979)] und Aspergillus-Wirte, wie A. nidulans [Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 284-289 (1983); Tilburn et al., Gene 26, 205-221 (1983); Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81, 1470-1474 (1984)] und A. niger [Kelly und Hynes, EMBO J. 4, 475-479 (1985)].

[0078] Geeignete Wirtszellen können auch von mehrzelligen Organismen stammen. Derartige Wirtszellen sind zu komplexen Prozessierungs- und Glykosylierungsaktivitäten fähig. Im Prinzip ist jede höhere eukaryotische Zellkultur, ungeachtet einer Vertrebrata- oder Invertrebratakultur, verwendbar, obwohl Zellen von Säugern, wie Menschen, bevorzugt sind. Beispiele für Invertebratazellen umfassen Pflanzen- und Insektenzellen. Zahlreiche Baculovirenstämme und -varianten und entsprechende permissive Insektenwirtszellen von Wirten wie Spodoptera frugiperda- (Käfer), Aedes aegypti- (Stechmücke), Aedes albopictus- (Stechmücke), Droso-

phila melangaster(Obstfliege) und Bombyx mori-Wirtszellen wurden identifiziert. Siehe beispielsweise Luckow et al., Bio/Technology 6, 47-55 (1988); Miller et al., in Genetic Engineering, J. K. Setlow et al., Hrsg., Band 8 (Plenum Publishing, 1986), S. 277-279; und Maeda et al., Nature 315, 592-594 (1985). Eine Vielzahl derartiger Virenstämme ist öffentlich verfügbar, beispielsweise die L-1-Variante von Autographa californica NPV, und derartige Viren können hier als der Virus gemäß der vorliegenden Erfindung, insbesondere zur Transfektion von Spodoptera frugiperda-Zellen verwendet werden.

[0079] Pflanzenzellkulturen von Baumwolle, Mais, Kartoffel, Sojabohne, Petunia, Tomate und Tabak können als Wirte verwendet werden. Typischerweise werden Pflanzenzellen durch Inkubation mit bestimmten Stämmen des Bakteriums Agrobacterium tumefaciens, das zuvor so manipuliert wurde, dass es die PTP-HSC-DNA enthält, transfiziert. Während der Inkubation der Pflanzenzellkultur mit A. tumefaciens wird die DNA mit Codierung für eine PTP-HSC auf den Pflanzenzellwirt derart übertragen, dass er transfiziert wird und unter geeigneten Bedingungen die PTP-HSC-DNA exprimiert. Ferner sind mit Pflanzenzellen kompatible regulatorische und Signalsequenzen verfügbar, beispielsweise der Nopalinsynthasepromotor und Polyadenylierungssignalsequenzen. Depicker et al., J. Mol. App. Gen. 1, 561 (1982). Ferner sind aus der strangaufwärtigen Region des T-DNA-780-Gens isolierte DNA-Segmente zur Aktivierung oder Erhöhung der Transkriptionsgrade von pflanzenexprimierbaren Genen in rekombinante DNA enthaltendem Pflanzengewebe fähig. Siehe EP 321196, veröffentlicht am 21. Juni 1989.

[0080] Jedoch war das Interesse an Vertebratazellen am größten und die Vermehrung von Vertrebratazellen in Kultur (Gewebekultur) ist als solche bekannt. Siehe Tissue Culture, Academic Press, Kruse und Patterson, Herausgeber (1973). Beispiele für verwendbare Säugerwirtszelllinien sind die Affennieren-CV1-Linie, transformiert mit SV40(COS-7, ATCC CRL 1651); humane Embryonierenzelllinie [293- oder 293-Zellen, die für Wachstum in Suspensionskultur subkloniert wurden, Graham et al., J. Gen. Virol. 36, 59 (1977)]; Babyhamsternierenzellen 9BHK, ATCC CCL 10), Chinese-Hamster-Ovary-Zellen/-DHFR [CHO, Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)]; Maus-Sertollizellen [TM4, Mather, Biol. Reprod. 23, 243-251 (1980)]; Affennierenzellen (CV1 ATCC CCL 70); African green monkey-Nierenzellen (VERO-76, ATCC CRL-1587); humane Gebärmutterhalskarzinomzellen (HELA, ATCC CCL 2); Hundenierenzellen (MDCK, ATCC CCL 34); Buffalorattenleberzellen (BRL 3A, ATCC CRL 1442); humane Lungenzellen (W138, ATCC CCL75); humane Leberzellen (Hep G2, HB 8065); Mausmammakarzinom (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-Zellen [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 44068 (1982)]; MRC-5-Zellen; FS4-Zellen; und eine humane Hepatomzelllinie (Hep G2). Bevorzugte Wirtszellen sind humane Embryonierenzellen 293 und Chinese-Hamster-Ovary-Zellen.

[0081] Besonders verwendbar bei der praktischen Durchführung dieser Erfindung sind Expressionsvektoren, die transiente Expression in Säugerzellen von DNA mit Codierung für eine PTP-HSC ermöglichen. Allgemein umfasst eine transiente Expression die Verwendung eines Expressionsvektors, der sich effizient in einer Wirtszelle derart replizieren kann, dass die Wirtszelle viele Kopien des Expressionsvektors ansammelt und wiederum hohe Mengen eines durch den Expressionsvektor codierten gewünschten Polypeptids synthetisiert. Transiente Systeme, die einen geeigneten Expressionsvektor und eine Wirtszelle umfassen, ermöglichen eine passende positive Identifizierung von durch DNA-Klone codierten Polypeptiden sowie das rasche Screening derartiger Polypeptide auf gewünschte biologische oder physiologische Eigenschaften. Daher sind transiente Expressionssysteme für die Zwecke der Identifizierung von Analoga und Varianten einer PTP-HSC in der Erfindung besonders geeignet. Andere Verfahren, Vektoren und Wirtszellen, die zur Adaptierung für die Synthese der PTP-HSC-Polypeptide in rekombinanter Vertrebratazellkultur geeignet sind, sind in Getting et al., Nature 293, 620-625 (1981); Mantel et al., Nature 281, 40-46 (1979); Levinson et al., EP 117060 und EP 117058 beschrieben. Besonders günstige Plasmide zur Säugerzellkulturexpression der PTP-HSC-Polypeptide sind pRK5 (EP 307247) oder pSVI6B (PCT-Veröffentlichung WO 91/08291).

[0082] Andere Klonierungs- und Expressionsvektoren, die zur Expression der PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung in einer Vielzahl von Wirtszellen geeignet sind, sind beispielsweise in EP 457758, veröffentlicht am 27. November 1991 beschrieben. Eine große Zahl von Expressionsvektoren ist derzeit im Handel erhältlich. Ein Beispiel für einen im Handel erhältlichen Hefexpressionsvektor ist pPIC.9 (Invitrogen), während ein zur Transformation von E. coli-Zellen geeigneter, im Handel erhältlicher Expressionsvektor PET15b (Novagen) ist.

C. Kultivieren der Wirtszellen

[0083] Zur Produktion der PTP-HSCs dieser Erfindung verwendete Prokaryotenzellen werden in geeigneten Medien gemäß der allgemeinen Beschreibung in Sambrook et al., aaO, kultiviert.

[0084] Säugerzellen können in einer Vielzahl von Medien kultiviert werden. Im Handel erhältliche Medien, wie

Ham-F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) und Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) sind zum Kultivieren der Wirtszellen geeignet. Ferner kann jedes der Medien, das bei Ham und Wallace, Meth. Enzymol. 58, 44 (1979); Barnes und Sato, Anal. Biochem. 102, 255 (1980), US 4767704, 4657866, 4927762 oder 4560655, WO 90/03430, WO 87/00195 oder US Pat. Re. 30985 beschrieben ist, als Kulturmedium für die Wirtszellen verwendet werden. Jedes dieser Medien kann, falls nötig, mit Hormonen und/oder anderen Wachstumsfaktoren (wie Insulin, Transferrin oder Epidermiswachstumsfaktor), Salzen (wie Natriumchlorid, Calcium, Magnesium und Phosphat), Puffermitteln (wie HEPES), Nucleosiden (wie Adenosin und Thymidin), Antibiotika (wie Gentamycin™-Wirkstoff), Spurenelementen (als anorganische Verbindungen, die üblicherweise in Endkonzentrationen im Mikromolbereich vorhanden sind, definiert) und Glukose oder einer äquivalenten Energiequelle ergänzt werden. Alle anderen notwendigen Ergänzungsmittel können ebenfalls in passenden Konzentrationen, die dem Fachmann bekannt sind, eingearbeitet werden. Die Kulturbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert und dergleichen, sind günstigerweise die zuvor bei der Wirtszelle, die zur Klonierung bzw. Expression gewählt wurde, verwendeten und sind dem Fachmann üblicher Erfahrung geläufig.

[0085] Die in dieser Offenbarung angegebenen Wirtszellen umfassen Zellen in einer in-vitro-Zellkultur sowie Zellen, die in einem Wirtstier oder in einer Wirtspflanze befindlich sind.

[0086] Es wird ferner in Betracht gezogen, dass die PTP-HSCs dieser Erfindung durch homologe Rekombination oder mit rekombinanten Produktionsverfahren unter Verwendung von Kontrollelementen, die in Zellen, die bereits DNA mit Codierung für die spezielle PTP-HSC enthalten, eingeführt wurden, produziert werden können.

D. Detektion von Genamplifikation/expression

[0087] Genamplifikation und/oder -expression können in einer Probe direkt, beispielsweise durch herkömmliches Southern Blotting, Northern Blotting zur quantitativen Bestimmung der Transkription von mRNA [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205 (1980)], Dot Blotting (DNA-Analyse) oder in-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer passend markierten Sonde auf der Basis der hier bereitgestellten Sequenzen ermittelt werden. Verschiedene Markierungen können verwendet werden, am häufigsten Radioisotope, insbesondere ^{32}P. Jedoch können auch andere Techniken verwendet werden, beispielsweise die Verwendung von Biotin-modifizierten Nucleotiden zur Einführung in ein Polynucleotid. Das Biotin dient dann als Bindungsstelle gegenüber Avidin oder Antikörpern, die mit einer breiten Vielzahl von Markierungen, wie Radionucliden, fluoreszierenden Stoffen, Enzymen oder dergleichen markiert sein können. Alternativ können Antikörper verwendet werden, die spezielle Doppelhelices, die DNA-Doppelhelices, RNA-Doppelhelices und DNA-RNA-Hybriddoppelhelices oder DNA-Protein- Doppelhelices umfassen, erkennen können. Die Antikörper wiederum können markiert sein, und ein Test kann durchgeführt werden, wenn die Doppelhelix an die Oberfläche gebunden ist, so dass bei Bildung einer Doppelhelix an der Oberfläche das Vorhandensein von an die Doppelhelix gebundenem Antikörper detektiert werden kann.

[0088] Eine Genexpression kann alternativ durch immunologische Verfahren ermittelt werden, beispielsweise die immunhistochemische Anfärbung von Gewebeschnitten und der Test einer Zellkultur oder von Körperflüssigkeiten zur direkten quantitativen Bestimmung der Expression eines Genprodukts. Bei immunhistochemischen Anfärbungstechniken wird eine Zellprobe typischerweise durch Dehydrierung und Fixierung hergestellt und anschließend folgt eine Reaktion mit für das gekoppelte Genprodukt spezifischen markierten Antikörpern, wobei die Markierungen üblicherweise optisch detektierbar sind, beispielsweise enzymatische Markierungen, Fluoreszenzmarkierungen, Lumineszenzmarkierungen und dergleichen. Eine besonders empfindliche Anfärbetechnik, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet ist, ist bei Hse et al., Am. J. Clin. Pharm. 75, 734-738 (1980) beschrieben.

[0089] Antikörper, die zur immunhistochemischen Anfärbung und/oder zum Test von Probenflüssigkeiten verwendbar sind, können entweder monoklonal oder polyklonal sein und in einem beliebigen Lebewesen hergestellt werden. Günstigerweise können die Antikörper gegenüber einem nativen PTP-HSC-Polypeptid oder gegenüber einem synthetischen Peptid auf der Basis der DNA-Sequenz, die hier bereitgestellt wird, gemäß der im Folgenden gegebenen Beschreibung hergestellt werden.

E. Aminosäuresequenzvarianten einer nativen PTP-HSC

[0090] Aminosäuresequenzvarianten von nativen PTP-HSCs werden nach einschlägig bekannten Verfahren durch Einführung passender Nucleotidänderungen in eine PTP-HSC-DNA oder durch in-vitro-Synthese des

gewünschten Polypeptids hergestellt. Es gibt zwei Hauptvariable bei der Konstruktion von Aminosäuresequenzvarianten: die Position des Mutationsorts und die Natur der Mutation. Mit Ausnahme von natürlich vorkommenden Allelen, die die Manipulation der DNA-Sequenz mit Codierung für die PTP-HSC nicht erfordern, werden die Aminosäuresequenzvarianten von PTP-HSCs vorzugsweise durch Mutation der DNA, um entweder ein Allel oder eine Aminosäuresequenzvariante, die in der Natur nicht vorkommt, zu erhalten, konstruiert.

[0091] Eine Gruppe der Mutationen wird innerhalb der Phosphatase (PTP)-Domäne der Enzyme der vorliegenden Erfindung erzeugt.

[0092] Nicht-konservative Substitutionen innerhalb dieser Domäne können zu PTP-HSC-Varianten führen, die deren Fähigkeit zur Dephosphorylierung von Thyrosinen verlieren, und daher als Antagonisten von nativen PTP-HSCs verwendbar sind. PTP-HSC-Varianten, die unter Verstärkung von deren enzymatischer Aktivität mutiert sind, sind beispielsweise als stärker wirksame Inhibitoren der Vorläufer/Stammzellendifferenzierung verwendbar.

[0093] Alternativ oder zusätzlich können Aminosäureänderungen an Stellen erfolgen, die sich bezüglich der PTP-HSC-Proteine von verschiedenen Arten oder in hochkonservierten Regionen in Abhängigkeit vom zu erreichenden Ziel unterscheiden. Stellen an derartigen Positionen werden typischerweise in Reihe modifiziert, beispielsweise durch (1) zunächst Substitution mit konservativen Wahlmöglichkeiten und dann mit radikaleren Selektionen in Abhängigkeit von den erreichten Zielen, (2) Deletion des Zielrests oder der Zielreste oder (3) Insertion von Resten der gleichen oder einer unterschiedlichen Klasse angrenzend zur Positionsstelle, oder Kombinationen der Optionen 1 – 3. Eine hilfreiche Technik wird als "Alaninscanning" bezeichnet (Cunningham und Wells, Science 244, 1081-1085 [1989]).

[0094] Nach der Identifizierung der gewünschten Mutation(en) kann das Gen mit Codierung für eine PTP-HSC-Variante beispielsweise durch chemische Synthese gemäß der obigen Beschreibung erhalten werden. Vorzugsweise wird DNA mit Codierung für eine PTP-HSC-Aminosäuresequenzvariante durch positionsspezifische Mutagenese von DNA, die eine früher hergestellte Variante oder eine Nichtvarianteversion der PTP-HSC codiert, hergestellt. Positionsgerichtete (positionsspezifische) Mutagenese ermöglicht die Produktion von PTP-HSC-Varianten durch die Verwendung spezifischer Oligonucleotidsequenzen, die die DNA-Sequenz der gewünschten Mutation codieren, sowie einer ausreichenden Zahl angrenzender Nucleotide zur Bereitstellung einer Primersequenz einer ausreichenden Größe und Sequenzkomplexität zur Bildung einer stabilen Doppelhelix auf beiden Seiten der Deletionsverbindung, die überspannt wird. Typischerweise wird ein Primer einer Länge von etwa 20 bis 25 Nucleotiden mit etwa 5 bis 10 Resten auf beiden Seiten der Sequenzverbindung, die geändert wird, bevorzugt. Allgemein sind die Techniken einer positionsspezifischen Mutagenese einschlägig bekannt, beispielsweise durch Veröffentlichungen wie Edelman et al., DNA 2, 183 (1983). Wie bekannt ist, verwendet die positionsspezifische Mutagenesetechnik typischerweise einen Phagenvektor, der in sowohl einzelsträngiger als auch doppelsträngiger Form existiert. Typische Vektoren, die bei positionsspezifischer Mutagenese verwendbar sind, umfassen Vektoren wie den M13-Phagen, der beispielsweise bei Messing et al., Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, A. Walton, Hrsg., Elsevier, Amsterdam (1981), offenbart ist. Dieser und andere Phagenvektoren sind im Handel erhältlich und deren Verwendung ist dem Fachmann bekannt. Ein durchführbares und effizientes Verfahren zur Konstruktion von auf Oligodesoxyribonucleotid gerichteten positionsspezifischen Mutationen in DNA-Fragmenten unter Verwendung von von M13 abgeleiteten Vektoren wurde von M. J. Zoller und M. Smith, Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500 [1982] veröffentlicht. Ferner können Plasmidvektoren, die einen Replikationsstartpunkt eines einzelsträngigen Phagen enthalten, (Veira et al., Meth. Enzymol. 153, 3 [1987]) zur Gewinnung von einzelsträngiger DNA verwendet werden. Alternativ werden Nucleotidsubstitutionen durch Synthese des passenden DNA-Fragments in vitro und Amplifikation desselben durch einschlägig bekannte PCR-Verfahren eingeführt.

[0095] Die PCR-Technik kann auch zur Erzeugung von Aminosäuresequenzvarianten einer PTP-HSC verwendet werden. In einem speziellen Beispiel für PCR-Mutagenese wird Templatplasmid-DNA (1 µg) durch Verdau mit einer Restriktionsendonuclease, die eine singuläre Erkennungsstelle in der Plasmid-DNA außerhalb der zu amplifizierenden Region hat, linearisiert. Von diesem Material werden 100 ng zu einem PCR-Gemisch, das PCR-Puffer enthält, das die vier Desoxynucleotidtriphosphate enthält und in den GeneAmp^{R}-Kits (erhalten von Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT und Emeryville, Ca) enthalten ist, und 25 pmol der einzelnen Oligonucleotidprimer enthält, zu einem Endvolumen von 50 µl gegeben. Das Reaktionsgemisch wird mit 35 µl Mineralöl überschichtet. Das Reaktionsgemisch wird 5 min bei 100 °C denaturiert, kurz auf Eis gesetzt und dann wird 1 µl Thermus aquaticus (Taq)-DNA-Polymerase (5 Einheiten/l, gekauft von Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, CT und Emeryville, CA) unter der Mineralölschicht zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird dann in einem DNA Thermal Cycler (von Perkin-Elmer Cetus gekauft) gesetzt, der wie folgt programmiert ist:

2 min 55 °C,
30 s 72 °C, dann 19 Zyklen des Folgenden:
30 s, 94 °C,
30 s 55 °C und
30 s 72 °C.

[0096] Am Ende des Programms wird die Reaktionsampulle aus dem Thermal Cycler entfernt und die wässrige Phase in eine neue Ampulle übertragen, mit Phenol/Chloroform (50:50 V) extrahiert und einer Ethanolausfällung unterzogen und die DNA durch Standardverfahren gewonnen. Dieses Material wird anschließend passenden Behandlungen zur Insertion in einem Vektor unterzogen.

[0097] Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Varianten, Kassettenmutagenese, basiert auf der von Wells et al. beschriebenen Technik [Gene 34, 315 (1985)].

[0098] Ferner kann das so genannte Phagemiddisplayverfahren bei der Herstellung von Aminosäuresequenzvarianten von nativen oder varianten PTP-HSCs oder deren Fragmenten verwendbar sein.

[0099] Dieses Verfahren umfasst (a) die Konstruktion eines replizierbaren Expressionsvektors, der ein zu mutierendes erstes Gen mit Codierung für einen Rezeptor, ein zweites Gen mit Codierung für mindestens einen Teil eines natürlichen oder Phagenhülleprotein des Wildtyps, wobei das erste und zweite Gen heterolog sind, und ein mit dem ersten und zweiten Gen funktionell verknüpftes, für die Transkription regulatorisches Element umfasst, wodurch eine ein Fusionsprotein codierende Genfusion gebildet wird; (b) die Mutation des Vektors an einer oder mehreren ausgewählten Positionen innerhalb des ersten Gens, wodurch eine Familie verwandter Plasmide gebildet wird; (c) die Transformation geeigneter Wirtszellen mit den Plasmiden; (d) die Infektion der transformierten Wirtszelle mit einem Helferphagen, der ein Gen mit Codierung für das Phagenhüllprotein aufweist; (e) das Kultivieren der transformierten infizierten Wirtszellen unter Bedingungen, die zur Bildung von rekombinanten Phagemidteilchen, die mindestens einen Teil des Plasmids enthalten und zur Transformation des Wirts fähig sind, geeignet sind, wobei die Bedingungen so eingestellt sind, dass nicht mehr als eine geringe Menge von Phagemidteilchen mehr als eine Kopie des Fusionsproteins auf der Oberfläche des Teilchens zeigt; (f) das Inkontaktbringen der Phagemidteilchen mit einem geeigneten Antigen derart, dass mindestens ein Teil der Phagemidteilchen an das Antigen bindet; und (g) die Abtrennung der Phagemidteilchen, die binden, von denen, die dies nicht tun. Die Stufen (d) bis (g) können einmal oder mehrere Male wiederholt werden. Vorzugsweise steht bei diesem Verfahren das Plasmid unter der strengen Kontrolle des für die Transkription regulatorischen Elements und die Kulturbedingungen sind so eingestellt, dass die Menge oder Zahl an Phagemidteilchen, die mehr als eine Kopie des Fusionsproteins auf der Oberfläche des Teilchens zeigen, weniger als etwa 1 beträgt. Ferner beträgt die Menge an Phagemidteilchen, die mehr als eine Kopie des Fusionsproteins zeigen, vorzugsweise weniger als 10 % der Menge an Phagemidteilchen, die eine Einzelkopie des Fusionsproteins zeigen. Noch besser beträgt die Menge weniger als 20 %. Typischerweise enthält der Expressionsvektor ferner eine sekretorische Signalsequenz, die mit der DNA mit Codierung für die einzelnen Untereinheiten des Polypeptids fusioniert ist, und das für die Transkription regulatorische Element ist ein Promotorsystem. Bevorzugte Promotorsysteme sind aus lac Z-, λ_{PL}-, tac-, T7-Polymerase-, Tryptophan- und alkalische-Phosphatase-Promotoren und Kombinationen derselben ausgewählt. Ferner verwendet das Verfahren normalerweise einen Helferphagen, der aus M13K07, M13R408, M13-VCS und PhiX174 ausgewählt ist. Die bevorzugte Helferphage ist M13K07, und das bevorzugte Hüllprotein ist das M13-Phage-Gen-III-Hülleprotein. Der bevorzugte Wirt ist E. coli und Protease-defiziente Stämme von E. coli.

[0100] Weitere Einzelheiten der im Vorhergehenden genannten und ähnlicher Mutagenesetechniken finden sind in allgemeinen Handbüchern, beispielsweise Sambrook et al., aaO, und Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Hrsg., aaO.

[0101] Natürlich vorkommende Aminosäuren werden auf der Basis ihrer gemeinsamen Seitenketteneigenschaften in Gruppen geteilt:

(1) hydrophob: Norleucin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
(2) neutral hydrophob: Cys, Ser, Thr;
(3) sauer: Asp, Glu;
(4) basisch: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
(5) Reste, die die Kettenorientierung beeinflussen; Gly, Pro; und
(6) aromatisch: Trp, Tyr, Phe.

[0102] Konservative Substitutionen umfassen den Austausch eines Elements innerhalb einer Gruppe durch

ein anderes Element innerhalb der gleichen Gruppe, während nichtkonservative Substitutionen den Austausch eines Elements von einer dieser Klassen durch ein anderes umfassen.

[0103] Aminosäuresequenzdeletionen liegen allgemein im Bereich von etwa 1 bis 30 Resten, vorzugsweise etwa 1 bis 10 Resten und typischerweise sind sie fortlaufend.

[0104] Aminosäureinsertionen umfassen Amino- und/oder carboxylterminale Fusionen im Bereich einer Länge von einem Rest bis zu Polypeptiden, die 100 oder mehr Reste enthalten, sowie Intrasequenzinsertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäureresten. Intrasequenzinsertionen (d. h. Insertionen innerhalb der PTP-HSC-Proteinaminosäuresequenz) können allgemein im Bereich von etwa 1 bis 10 Resten, vorzugsweise 1 bis 5 Resten, noch besser 1 bis 3 Resten liegen. Beispiele für terminale Insertionen umfassen die PTP-HSC-Polypeptide mit einem N-terminalen Methionylrest, einem Artefakt von dessen direkter Expression in einer rekombinanten Bakterienzellkultur, und eine Fusion einer heterologen N-terminalen Signalsequenz mit dem N-Terminus des PTP-HSC-Moleküls zur Erleichterung der Sekretion der reifen PTP-HSC aus rekombinanten Wirtszellen. Derartige Signalsequenzen werden allgemein von der geplanten Wirtszellart erhalten und sind daher zu dieser homolog. Geeignete Sequenzen umfassen STII oder lpp für E. coli, Alpha-Faktor für Hefe und Virussignale, wie Herpes-gD, für Säugerzellen.

[0105] Andere Insertionsvarianten der nativen PTP-HSC-Moleküle umfassen die Fusion des N- oder C-Terminus des TRAF-Moleküls mit immunogen Polypeptiden, beispielsweise Bakterienpolypeptiden, wie β-Lactamase, oder einem durch den E. coli-trp-Locus codierten Enzym oder einem Hefeprotein und C-terminale Fusionen mit Proteinen mit einer langen Halbwertszeit, beispielsweise Immunglobulinregionen (vorzugsweise konstante Regionen von Immunglobulinen), Albumin oder Ferritin gemäß der Beschreibung in WO 89/02922, veröffentlicht am 6. April 1989.

[0106] Da es häufig schwierig ist, im voraus die Eigenschaften einer varianten PTP-HSC vorherzusagen, ist klar, dass ein Screening notwendig ist, um die optimale Variante zu selektieren.

F. Kovalente Modifikationen von PTP-HSC-Polypeptiden

[0107] Kovalente Modifikationen von PTP-HSCs werden hier vom Umfang umfasst. Derartige Modifikationen werden traditionell durch Umsetzung von als Ziel ausgewählten Aminosäureresten der PTP-HSC-Polypeptide mit einem organischen Derivatisierungsmittel, das mit ausgewählten Stellen oder terminalen Resten reagieren kann, oder durch die Nutzung von Mechanismen posttranslationaler Modifikationen, die in ausgewählten rekombinanten Wirtszellen funktionieren, eingeführt. Die gebildeten kovalenten Derivate sind bei Programmen, die auf die Identifizierung von für biologische Aktivität wichtigen Resten gerichtet sind, für Immunoassays der PTP-HSC oder zur Herstellung von Anti-PTP-HSC-Antikörpern zur Immunaffinitätsreinigung der Rekombinante verwendbar. Beispielsweise legt die vollständige Inaktivierung der biologischen Aktivität des Proteins nach einer Reaktion mit Ninhydrin nahe, dass mindestens ein Arginyl- oder Lysylrest für dessen Aktivität entscheidend notwendig ist, während die individuellen Reste, die unter den gewählten Bedingungen modifiziert werden, durch Isolierung eines Peptidfragments, das den modifizierten Aminosäurerest enthält, identifiziert werden. Derartige Modifikationen sind dem Fachmann geläufig und werden ohne übermäßigen Arbeitsaufwand durchgeführt.

[0108] Cysteinylreste werden sehr häufig mit α-Halogenacetaten (und entsprechenden Aminen), wie Chloressigsäure oder Chloracetamid, unter Bildung von Carboxymethyl- oder Carboxyamidomethylderivaten umgesetzt. Cysteinylreste werden ebenfalls durch Reaktion mit Bromtrifluoraceton, α-Brom-β-(5-imidozoyl)propionsäure, Chloracetylphosphat, N-Alkylmaleimiden, 3-Nitro-2-pyridyldisulfid, Methyl-2-pyridyldisulfid, p-Chlorquecksilber(II)-benzoat, 2-Chlorquecksilber(II)-4-nitrophenol oder Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol derivatisiert.

[0109] Histidylreste werden durch Reaktion mit Diethylpyrocarbonat bei pH 5,5 – 7,0 derivatisiert, da dieses Mittel relativ spezifisch für die Histidylseitenkette ist. Para-Bromphenacylbromid ist ebenfalls verwendbar; die Reaktion wird vorzugsweise in 0,1 M Natriumcacodylat bei pH 6,0 durchgeführt.

[0110] Lysinyl- und aminoterminale Reste werden mit Bernsteinsäure- oder anderen Carbonsäureanhydriden umgesetzt. Die Derivatisierung mit diesen Mitteln hat die Wirkung der Aufhebung der Ladung der Lysinylreste. Andere geeignete Reagenzien zur Derivatisierung von α-Amino-haltigen Resten umfassen Imidoester, wie Methylpicolinimidat; Pyridoxalphosphat; Pyridoxal; Chlorborhydrid; Trinitrobenzolsulfonsäure; O-Methylisoharnstoff; 2,4-Pentandion; und eine Transaminasekatalysierte Reaktion mit Glyoxylat.

[0111] Arginylreste werden durch Reaktion mit einem oder mehreren herkömmlichen Reagenzien, zu denen Phenylglyoxal, 2,3-Butandion, 1,2-Cyclohexandion und Ninhydrin gehören, modifiziert. Die Derivatisierung von Argininresten erfordert, dass die Reaktion wegen des hohen pK_a-Werts der funktionalen Guanidingruppe unter alkalischen Bedingungen durchgeführt wird. Ferner können diese Reagenzien mit den Lysingruppen sowie der Epsilon-Aminogruppe von Arginin reagieren.

[0112] Die spezielle Modifikation von Tyrosylresten kann mit einem speziellen Interesse an der Einführung von spektralen Markierungen in Tyrosylreste durch Reaktion mit aromatischen Diazoniumverbindungen oder Tetranitromethan durchgeführt werden. Sehr häufig werden N-Acetylimidzol und Tetranitromethan zur Bildung von O-Acetyltyrosylspezies bzw. 3-Nitroderivaten verwendet. Tyrosylreste werden unter Verwendung von ^{125}I oder ^{131}I iodiert, um markierte Proteine zur Verwendung in Radioimmunoassays herzustellen.

[0113] Carboxylseitengruppen (Aspartyl oder Glutamyl) werden durch Reaktion mit Carbodiimiden (R'-N=C=N-R'), wie 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl)carbodiimid oder 1-Ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpenthyl)carbodiimid, selektiv modifiziert. Ferner werden Aspartyl- und Glutamylreste durch Reaktion mit Ammoniumionen in Asparaginyl- und Glutaminylreste umgewandelt.

[0114] Glutaminyl- und Asparaginylreste werden häufig zu den entsprechenden Glutamyl- und Aspartylresten desamidiert. Alternativ werden diese Reste unter mild sauren Bedingungen desamidiert. Beide Formen dieser Reste fallen unter den Umfang dieser Erfindung.

[0115] Andere Modifikationen umfassen die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl-, Threonyl- oder Tyrosylresten, die Methylierung von α-Aminogruppen von Lysin-, Arginin- und Histidinseitenketten (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, S. 79-86 [1983]), die Acetylierung des N-terminalen Amins und die Amidierung einer C-terminalen Carboxylgruppe. Die Moleküle können ferner zu nicht-proteinartigen Polymeren, beispielsweise Polyethylenglykol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene, in der in USSN 07/275296 oder den US-Patenten 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 oder 4179337 angegebenen Weise kovalent verknüpft sein.

[0116] Eine Derivatisierung mit bifunktionalen Mitteln ist zur Herstellung von intramolekularen Aggregaten der PTP-HSCs mit Polypeptiden sowie zur Vernetzung des PTP-HSC-Polypeptids mit einer in Wasser unlöslichen Trägermatrix oder Oberfläche zur Verwendung bei Tests oder Affinitätsreinigung verwendbar. Ferner ergibt eine Untersuchung von Verknüpfungen zwischen Ketten eine direkte Information über die Konformationsstruktur. Üblicherweise verwendete Verknüpfungsmittel umfassen 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, homobifunktionale Imidoester und bifunktionale Maleimide. Derivatisierungsmittel wie Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat ergeben photoaktivierbare Zwischenprodukte, die in Gegenwart von Licht Verknüpfungen bilden können. Alternativ werden reaktive, in Wasser unlösliche Matrices, wie durch Bromcyan aktivierte Kohlenhydrate und die systemreaktiven Substrate gemäß der Beschreibung in US-Patent 3959642, 3969287, 3691016, 4195128, 4247642, 4229537, 4055635 und 4330440, zur Proteinimmobilisierung und Verknüpfung bzw. Vernetzung verwendet.

[0117] Bestimmte posttranslationale Modifikationen sind das Ergebnis der Wirkung rekombinanter Wirtszellen auf das exprimierte Polypeptid. Glutaminyl- und Asparaginylreste werden häufig posttranslational zu den entsprechenden Glutamyl- und Aspartylresten desamidiert. Alternativ werden diese Reste unter mildsauren Bedingungen desamidiert. Beide Formen dieser Reste fallen unter den Umfang dieser Erfindung.

[0118] Andere posttranslationale Modifikationen umfassen die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Seryl-, Threonyl- oder Tyrosylresten, die Methylierung der α-Aminogruppen von Lysin, Arginin und Histidinseitenketten [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, S. 79-86 (1983)].

[0119] Andere Derivate umfassen die neuen Peptide dieser Erfindung kovalent an ein nicht-proteinartiges Polymer gebunden. Das nicht-proteinartiges Polymer ist üblicherweise ein hydrophiles synthetisches Polymer, d. h. ein Polymer, das sonst in der Natur nicht gefunden wird. Jedoch sind Polymere, die in der Natur vorkommen und durch rekombinante oder in-vitro-Verfahren produziert werden, verwendbar, wie auch Polymere, die aus der Natur isoliert werden. Hydrophile Polyvinylpolymere fallen unter den Umfang dieser Erfindung, beispielsweise Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon. Besonders verwendbar sind Polyvinylalkylenether, wie Polyethylenglykol, Polypropylenglykol.

[0120] Die PTP-HSC-Polypeptide können an verschiedene nicht-proteinartige Polymere, wie Polyethylengly-

kol, Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene, in der in US-Patent 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 oder 4179337 angegebenen Weise gebunden werden.

[0121] Die PTP-HSCs können in Mikrokapseln, die beispielsweise durch Koazervationstechniken oder durch Grenzflächenpolymerisation hergestellt wurden, in kolloiden Arzneimittelabgabesystemen (beispielsweise Liposomen, Albuminmikrokügelchen, Mikroemulsionen, Nanopartikeln und Nanokapseln) oder Makroemulsionen enthalten sein. Derartige Techniken sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Osol, Hrsg. (1980), offenbart.

G. Anti-PTP-HSC-Antikörper-Herstellung

(i) Polyklonale Antikörper

[0122] Polyklonale Antikörper gegenüber einem PTP-HSC-Molekül können allgemein bei Tieren durch mehrfache subkutane (sc) oder intraperitoneale (ip) Injektionen der PTP-HSC und eines Adjuvans gebildet werden. Es kann günstig sein, die PTP-HSC oder ein Fragment, die die Zielaminosäuresequenz enthalten, mit einem Protein, das in der zu immunisierenden Art immunogen ist, beispielsweise Schlüssellochschneckenhämocyanin, Serumalbumin, Rinderthyroglobulin oder Sojatrypsininhibitor, unter Verwendung eines bifunktionalen oder Derivatisierungsmittels, beispielsweise Maleimidobenzoylsulfosuccinimidester (Konjugation über Cysteinreste), N-Hydroxysuccinimid (über Lysinreste), Glytaraldehyd, Bernsteinsäureanhydrid, $SOCl_2$ oder $R^1N=C=NR$, wobei R und R^1 unterschiedliche Alkylgruppen sind, zu konjugieren.

[0123] Die Tiere werden gegen die immunogenen Konjugate oder Derivate durch Kombination von 1 mg oder 1 µg des Konjugats (für Kaninchen bzw. Mäuse) mit 3 Volumina von komplettem Freundschem Adjuvans und intradermale Injektion der Lösung an mehreren Stellen immunisiert. Einen Monat später werden die Tiere zur Verstärkung mit 1/5 bis 1/10 der ursprünglichen Menge des Konjugats in komplettem Freundschem Adjuvans durch subkutane Injektion an mehreren Stellen geimpft. 7 bis 14 Tage später werden den Tieren Blutproben entnommen und das Serum auf den Anti-PTP-HSC-Antikörpertiter getestet. Die Tiere werden zur Verstärkung geimpft, bis der Titer ein Plateau erreicht. Vorzugsweise werden die Tiere mit dem Konjugat des gleichen PTP-HSC, jedoch an ein unterschiedliches Protein und/oder durch ein unterschiedliches Verknüpfungsreagens konjugiert, zur Verstärkung geimpft. Konjugate können auch in einer rekombinanten Zellkultur als Proteinfusionen hergestellt werden. Auch werden Aggregationsmittel, wie Alaun, zur Verstärkung der Immunreaktion verwendet.

(ii) Monoklonale Antikörper

[0124] Monoklonale Antikörper werden aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern d. h. die die Population umfassenden individuellen Antikörper sind mit Ausnahme dessen, das mögliche natürlich vorkommende Mutationen in geringen Mengen vorhanden sein können, identisch, erhalten. Daher gibt die Modifikation "monoklonal" den Charakter des Antikörpers als kein Gemisch diskreter Antikörper an.

[0125] Beispielsweise können die Anti-PTP-HSC-monoklonalen-Antikörper der Erfindung unter Verwendung des Hybridomverfahrens, das von Kohler & Milstein, Nature 256:495 (1975) als erstes beschrieben wurde, oder durch Gentechnikverfahren [Cabilly et al., US-Patent 4816567] hergestellt werden.

[0126] Bei dem Hybridomverfahren wird eine Maus oder ein anderes geeignetes Wirtstier, beispielsweise ein Hamster, wie oben beschrieben, immunisiert, um Lymphozyten anzuregen, die Antikörper, die spezifisch an das zur Immunisierung verwendete Protein binden, produzieren oder produzieren können. Alternativ können Lymphozyten in vitro immunisiert werden. Die Lymphozyten werden dann mit Myelomzellen unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, wie Polyethylenglykol, fusioniert, wobei eine Hybridomzelle gebildet wird [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, S. 59-103 (Academic Press, 1986)].

[0127] Die auf diese Weise hergestellten Hybridomzellen werden in einem geeigneten Kulturmedium, das vorzugsweise ein oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der nicht-fusionierten Stammmyelomzellen hemmen, ausgesät und gezüchtet. Beispielsweise umfasst, wenn der Stammmyelomzelle das Enzym Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT) fehlt, das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium), wobei diese Substanzen das Wachstum von HGPRT-defizienten Zellen verhindern.

[0128] Bevorzugte Myelomzellen sind diejenigen, die effizient fusionieren, eine stabile hochgradige Expres-

sion von Antikörper durch die ausgewählten Antikörper produzierenden Zellen stützen und gegenüber einem Medium wie HAT-Medium empfindlich sind. Von diesen sind bevorzugte Myelomzelllinien murine Myelomlinien, wie die von den MOPC-21- und MPC-11-Maustumoren abgeleiteten, die von den Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA erhältlich sind, und SP-2-Zellen, erhältlich von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Humane Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelomzelllinien wurden ebenfalls zur Produktion von humanen monoklonalen Antikörpern beschrieben [Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, S. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].

[0129] Ein Kulturmedium, in dem Hybridomzellen wachsen, wird auf die Produktion von gegen PTP-HSC gerichteten monoklonalen Antikörpern getestet. Vorzugsweise wird die Bindungsspezifität von durch Hybridomzellen produzierten monoklonalen Antikörpern durch Immunfällung oder durch einen in-vitro-Bindungstest, beispielsweise Radioimmunoassay (RIA) oder enzymgekoppelten Immunabsorbtionstest (ELISA), bestimmt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann beispielsweise durch die Scatchard-Analyse von Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107:220 (1980) bestimmt werden.

[0130] Nachdem Hybridomzellen, die Antikörper der gewünschten Spezifität, Affinität und/oder Aktivität produzieren, identifiziert sind, können die Klone durch Grenzverdünnungsverfahren subkloniert und durch Standardverfahren gezüchtet werden. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, S. 59-104 (Acedemic Press, 1986). Geeignete Kulturmedien für diesen Zweck umfassen beispielsweise Dulbecco's Modified Eagle's Medium oder RPMI-1640-Medium. Ferner können die Hybridomzellen in vivo als Ascitestumore in einem Tier gezüchtet werden.

[0131] Die durch die Subklone sezernierten monoklonalen Antikörper werden von dem Kulturmedium, der Ascitesflüssigkeit oder Serum durch herkömmliche Immunglobulinreinigungsverfahren, beispielsweise Protein-A-Sepharose-, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, in geeigneter Weise abgetrennt.

[0132] DNA mit Codierung für die monoklonalen Antikörper der Erfindung wird unter Verwendung herkömmlicher Verfahren (beispielsweise durch Verwendung von Oligonucleotidsonden, die spezifisch an Gene mit Codierung für die schweren und leichten Ketten von Mausantikörpern binden können) ohne weiteres isoliert und sequenziert. Die Hybridomzellen der Erfindung dienen als bevorzugte Quelle von derartiger DNA. Sobald die DNA isoliert ist, kann sie in Expressionsvektoren platziert werden, die dann in Wirtszellen, wie Affen-COS-Zellen, Chinese-Hamster-Ovary(CHO)-Zellen oder Myelomzellen, die sonst kein Immunglobulinprotein produzieren, transfiziert werden, um die Synthese von monoklonalen Antikörpern in den rekombinanten Wirtszellen zu erhalten. Die DNA kann ferner beispielsweise durch Substitution der Codierungssequenz für humane konstante Domänen der schweren und leichten Kette anstelle der homologen Maussequenzen, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 81, 6851 (1984), oder durch kovalente Verknüpfung der gesamten oder eines Teils der codierenden Sequenz für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid mit der Immunglobulincodierungssequenz modifiziert werden. Auf diese Weise werden "chimäre" oder "hybride" Antikörper hergestellt, die die Bindungsspezifität eines anti-TRAF-monoklonalen-Antikörpers hierbei aufweisen.

[0133] Typischerweise werden derartige Nicht-Immunglobulin-Polypeptide für die konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung substituiert oder sie werden für die variablen Domänen einer Antigen bindenden Stelle eines Antikörpers der Erfindung unter Erzeugung eines chimären zweiwertigen Antikörpers, der eine Antigen bindende Stelle mit Spezifität für eine PTP-HSC und eine andere Antigen bindende Stelle mit Spezifität für ein unterschiedliches Antigen besitzt, substituiert.

[0134] Chimäre oder hybride Antikörper können auch in vitro unter Verwendung von in der Proteinsynthesechemie bekannten Verfahren, die solche unter Beteiligung von Vernetzungsmitteln umfassen, hergestellt werden. Beispielsweise können Immuntoxine unter Verwendung einer Disulfidaustauschreaktion oder durch Bildung einer Thioetherbindung konstruiert werden.

[0135] Beispiele für für diesen Zweck geeignete Reagenzien umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptobutyrimidat.

[0136] Für diagnostische Anwendungen werden die Antikörper der Erfindung typischerweise mit einer detektierbaren Einheit markiert. Die detektierbare Einheit kann eine sein, die entweder direkt oder indirekt ein detektierbares Signal produzieren kann. Beispielsweise kann die detektierbare Einheit ein Radioisotop, beispielsweise ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S oder ^{125}I, eine fluoreszierende oder chemilumineszierende Verbindung, wie Fluoresce-

nisothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin; Biotin; radioaktive Isotopmarkierungen, beispielsweise ^{125}I, ^{32}P, ^{14}C oder ^{3}H, oder ein Enzym, wie alkalische Phosphatase, β-Galactosidase oder Meerrettichperoxidase, sein.

[0137] Jedes einschlägig bekannte Verfahren zur getrennten Konjugation des Antikörpers mit der detektierbaren Einheit kann verwendet werden, einschließlich der Verfahren gemäß der Beschreibung bei Hunter et al., Nature 144:945 (1962); David et al., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); und Nygren, J. Histochem. und Cytochem. 30:407 (1982).

[0138] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können bei jedem bekannten Testverfahren, beispielsweise kompetitiven Bindungstests, direkten und indirekten Sandwichtests und Immunfällungstests, verwendet werden. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, S. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

[0139] Kompetitive Bindungstests beruhen auf der Fähigkeit eines markierten Standards (der ein PTP-HSC-Polypeptid oder ein immunologisch reaktiver Teil desselben sein kann), mit dem Testprobenanalyt (PTP-HSC) um die Bindung an einer beschränkten Antikörpermenge zu konkurrieren. Die Menge an PTP-HSC einer Testprobe ist umgekehrt proportional zur Menge des Standards, die an den Antikörpern gebunden wird. Zur Erleichterung der Bestimmung der Menge des Standards, die gebunden wird, werden die Antikörper allgemein vor oder nach dem Konkurrieren unlöslich gemacht, so dass der Standard und der Analyt, die an die Antikörper gebunden sind, bequem von dem Standard und dem Analyt, die ungebunden bleiben, bequem abgetrennt werden können.

[0140] Sandwichassays umfassen die Verwendung von zwei Antikörpern, die jeweils einen unterschiedlichen immunogenen Teil oder Epitop des zu detektierenden Proteins binden können. Bei einem Sandwichassay wird der Testprobenanalyt durch einen ersten Antikörper, der auf einem festen Träger immobilisiert ist, gebunden und danach bindet ein zweiter Antikörper an den Analyt, wodurch ein unlöslicher dreiteiliger Komplex gebildet wird. David & Greene, US Patent 43767110. Der zweite Antikörper kann selbst mit einer detektierbaren Einheit markiert sein (direkte Sandwichassays) oder unter Verwendung eines Anti-Immunglobulin-Antikörpers, der mit einer detektierbaren Einheit markiert ist, ermittelt werden (indirekter Sandwichassay). Beispielsweise ist eine Art eines Sandwichassays ein ELISA-Assay, wobei in diesem Fall die detektierbare Einheit ein Enzym ist.

(iii) Humanisierte Antikörper

[0141] Verfahren zur Humanisierung nichthumaner Antikörper sind einschlägig bekannt. Allgemein sind in einem humanisierten Antikörper ein oder mehrere Aminosäurereste aus einer nichthumanen Quelle eingeführt. Diese nichthumanen Aminosäurereste werden häufig als "Import"-Reste bezeichnet, die typischerweise einer "Import"-variablen-Domäne entnommen sind. Eine Humanisierung kann im Wesentlichen gemäß dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern [Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988)] durch Substitution von Nagetier-CDRs oder -CDR-Sequenzen durch die entsprechenden Sequenzen eines humanen Antikörpers durchgeführt werden. Dementsprechend sind derartige "humanisierte" Antikörper chimäre Antikörper (Cabilly, aaO), worin im Wesentlichen weniger als eine intakte humane variable Domäne durch die entsprechende Sequenz von einer nichthumanen Art substituiert wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise humane Antikörper, in denen einige CDR-Reste und möglicherweise einige FR-Reste durch Reste von analogen Stellen in Nagetierantikörpern substituiert sind.

[0142] Es ist wichtig, dass Antikörper unter Beibehaltung von hoher Affinität für das Antigen und anderen günstigen biologischen Eigenschaften humanisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden nach einem bevorzugten Verfahren humanisierte Antikörper durch ein Verfahren der Analyse der Stammsequenzen und verschiedener geplanter humanisierter Produkte unter Verwendung von dreidimensionalen Modellen der Stamm- und humanisierten Sequenzen hergestellt. Dreidimensionale Immunglobulinmodelle sind häufig verfügbar und dem Fachmann bekannt. Computerprogramme sind verfügbar, die wahrscheinliche dreidimensionale Konformationsstrukturen ausgewählter Kandidatenimmunglobulinsequenzen erläutern und zeigen. Die Inspektion dieser Darstellungen ermöglicht die Analyse der wahrscheinlichen Rolle der Reste in der Funktionsweise der Kandidatenimmunglobulinsequenz, d. h. die Analyse von Resten, die die Fähigkeit des Kandidatenimmunglobulins zur Bindung an dessen Antigen beeinflussen. Auf diese Weise können FR-Reste aus der Konsensus- und Importsequenz so ausgewählt und kombiniert werden, dass die gewünschte Antikörpereigenschaft, beispielsweise eine erhöhte Affinität für das Zielantigen bzw. die Zielantigene, erreicht wird. Allgemein sind die CDR-Reste direkt und sehr wesentlich an der Beeinflussung der Antigenbindung beteiligt. Für weitere Einzelheiten siehe die US-Anmeldung 07/934373, eingereicht am 21. August 1992, die eine Continuation-in-part der Anmeldung 07/715272, eingereicht am 14. Juni 1991 ist.

[0143] Alternativ ist es nun möglich, transgene Tiere (beispielsweise Mäuse) zu erzeugen, die bei Immunisierung ein vollständiges Repertoire humaner Antikörper bei Abwesenheit einer endogenen Immunglobulinproduktion produzieren können. Beispielsweise wurde beschrieben, dass die homozygote Deletion des Gens der Gelenkregion der schweren Kette (J_H) des Antikörpers in chimären und eine Keimlinienmutation aufweisenden Mäusen zur vollständigen Hemmung der endogenen Antikörperproduktion führt. Die Übertragung der humanen Keimlinienimmunglobulingenanordnung in derartigen Mäusen mit Keimlinienmutation führt zur Produktion humaner Antikörper bei Antigenexposition. Siehe beispielsweise Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258 (1993).

(iv) Bispezifische Antikörper

[0144] Bispezifische Antikörper sind monoklonale, vorzugsweise humane oder humanisierte Antikörper, die Bindungsspezifitäten für mindestens zwei unterschiedliche Antigene aufweisen. Im vorliegenden Fall besteht eine der Bindungsspezifitäten für PTP-HSC, die andere für ein anderes Antigen, beispielsweise ein auf der Oberfläche einer Leukämiezelle exprimiertes Antigen, wenn der Antikörper ein Antagonist einer nativen PTP-HSC ist und zur Induktion der Differenzierung von undifferenzierten Leukämiezellen verwendet wird. Wenn ein spezifisch an native PTP-HSC bindender Agonistantikörper zur Expansion von Stammzellen mit Wachstumsfaktoren, wie im Folgenden beschrieben, verwendet wird, könnte die zweite Spezifität von einem Stammzellwachstumsfaktor geliefert werden. Derartige Konstrukte können auch als bispezifische Immunadhäsine bezeichnet werden. Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper (und bispezifischer Immunadhäsine) sind einschlägig bekannt.

[0145] Traditionell basiert die rekombinante Produktion bispezifischer Antikörper auf der Koexpression von zwei Immunglobulin-schwere Kette-leichte Kette-Paaren, wobei die zwei schweren Ketten unterschiedliche Spezifitäten aufweisen (Milstein und Cuello, Nature 305, 537-539 (1983)). Wegen der Zufallszusammenstellung der schweren und leichten Ketten des Immunglobulins produzieren diese Hybridome (Quadrome) ein mögliches Gemisch von 10 unterschiedlichen Antikörpermolekülen, von denen nur eines die korrekte bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des korrekten Moleküls, die üblicherweise durch Affinitätschromatographiestufen erfolgt, ist ziemlich mühsam und die Produktausbeuten sind niedrig. Ähnliche Verfahren sind in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 93/08829 (veröffentlicht am 13. Mai 1993) und in Traunecker et al., EMBO 10, 3655-3659 (1991) offenbart.

[0146] Gemäß einem unterschiedlichen und stärker bevorzugten Ansatz werden variable Domänen eines Antikörpers mit den gewünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper/Antigen-Kombinationsstellen) mit Sequenzen der konstanten Domäne eines Immunglobulins fusioniert. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit der konstanten Domäne der schweren Kette eines Immunglobulins, die mindestens einen Teil der Gelenkregion und die zweite und dritte konstante Region der schweren Kette eines Immunglobulins (CH2 und CH3) umfasst. Vorzugsweise ist die erste konstante Region der schweren Kette (CH1), die die zur Bindung der leichten Kette notwendige Stelle enthält, in mindestens einer der Fusionen vorhanden. DNAs mit Codierung für die Fusionen der schweren Kette des Immunglobulins und, falls gewünscht, der leichten Kette des Immunglobulins werden in getrennte Expressionsvektoren insertiert und in einen geeigneten Wirtsorganismus cotransfiziert. Dies ergibt eine große Flexibilität bei der Einstellung der gegenseitigen Anteile der drei Polypeptidfragmente in Ausführungsformen, wenn ungleiche Anteile der drei Polypeptidketten, die bei der Konstruktion verwendet werden, die optimalen Ausbeuten ergeben. Es ist jedoch möglich, die Codierungssequenzen für zwei oder alle drei Polypeptidketten in einen Expressionsvektor zu insertieren, wenn die Expression von mindestens zwei Polypeptidketten in gleichen Anteilen zu hohen Ausbeuten führt oder wenn die Anteile von keiner speziellen Bedeutung sind. In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Ansatzes bestehen die bispezifischen Antikörper aus einer hybriden schweren Kette eines Immunglobulins mit einer ersten Bindungsspezifität in einem Arm und einem Hybrid-Immunglobulin-schwere Kette/leichte Kette-Paar (das eine eine zweite Bindungsspezifität bereitstellt) im anderen Arm. Es wurde ermittelt, dass diese asymmetrische Struktur die Abtrennung der gewünschten bispezifischen Verbindung von unerwünschten Immunglobulinkettenkombinationen erleichtert, da das Vorhandensein einer leichten Kette eines Immunglobulins in nur einer Hälfte des bispezifischen Moleküls einen einfachen Weg zur Abtrennung ergibt. Dieser Ansatz ist in der gleichzeitig anhängigen Anmeldung 07/931811, eingereicht am 17. August 1992, offenbart.

[0147] Für weitere Einzelheiten zur Erzeugung bispezifischer Antikörper siehe beispielsweise Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

(v) Heterokonjugatantikörper

[0148] Heterokonjugatantikörper liegen ebenfalls innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung. Heterokonjugatantikörper bestehen aus zwei kovalent verbundenen Antikörpern. Derartige Antikörper wurden beispielsweise zur Zielrichtung von Immunsystemzellen auf unerwünschte Zellen (US-Patent 4676980) und zur Behandlung einer HIV-Infektion (veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 91/00360 und WO 92/200373; EP 03089) vorgeschlagen. Heterokonjugatantikörper können unter Verwendung beliebiger herkömmlicher Verknüpfungsverfahren hergestellt werden. Geeignete Verknüpfungsmittel sind einschlägig bekannt und in US-Patent 4676980 zusammen mit einer Zahl von Verknüpfungstechniken offenbart.

H. Peptid- und Nichtpeptidanaloga von Polypeptid-PTP-HSCs

[0149] Peptidanaloga der PTP-HSC-Polypeptide der vorliegenden Erfindung werden auf der Basis der dreidimensionalen Struktur der nativen Polypeptide modelliert. Peptide können durch bekannte Techniken, beispielsweise die Festphasensynthesetechniken, die als erstes bei Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 15, 2149-2154 (1963), beschrieben wurden, synthetisiert werden. Andere Peptidsynthesetechniken sind beispielsweise bei Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2. Auflage, 1976, sowie in anderen Referenzbüchern, die dem Fachmann ohne weiteres verfügbar sind, beschrieben. Eine Zusammenfassung von Peptidsynthesetechniken findet sich bei Stuart und Young, Solid Phase Peptide Synthelia, Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984). Peptide können auch durch Gentechnik unter Verwendung einer DNA-Sequenz mit Codierung für das gewünschte Peptid hergestellt werden.

[0150] Zusätzlich zu Peptidanaloga betrachtet die vorliegende Erfindung auch Nichtpeptid(beispielsweise organische)-Verbindungen, die im Wesentlichen die gleiche Oberfläche wie die Peptidanaloga der vorliegenden Erfindung zeigen und daher mit anderen Molekülen auf ähnliche Weise wechselwirken.

I. Verwendung der PTP-HSCs

[0151] Die PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung sind für eine Vielzahl von Zwecken verwendbar. Beispielsweise sind native PTP-HSCs zur Identifizierung und Isolierung eines PTP-HSC-Analogons in anderen Säugerarten verwendbar. Native PTP-HSCs und deren funktionale Äquivalente sind auch bei Screening Assays, die zur Identifizierung von Agonisten oder Antagonisten von nativen PTP-HSCs gestaltet sind, verwendbar. Derartige Assays können die Form eines herkömmlichen Zellart- oder biochemischen Bindungstests erhalten und in einer Vielzahl von Testformaten, die dem Fachmann bekannt sind, durchgeführt werden. Ein Beispiel ist das sogenannte "Doppelhybrid"assayformat unter Verwendung des Matchmaker Two-Hybrid System (Clontech) nach den Vorschriften des Herstellers.

[0152] Die PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung sowie deren Agonisten können ferner zur Aufrechterhaltung von Stamm/Vorläuferzellen in Zellkultur verwendet werden. Agonisten, die die Differenzierung hemmen, jedoch das Wachstum hämopoetischer Stammzellen ermöglichen, sind für diesen Zweck besonders günstig, da deren Verwendung zu einer Amplifizierung der Stammzellen ohne Differenzierung (Selbsterneuerung) führt. Dieses Verfahren kann beispielsweise für die Expansion von hämopoetischen Stammzellen vor einer autologen oder heterologen Knochenmarktransplantation verwendbar sein. Der gleiche Ansatz kann in vivo zur Expansion von Stammzellen mit Wachstumsfaktoren bei Abwesenheit von Differenzierung verwendet werden.

[0153] Es wird angenommen, dass die nativen PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung in Leukämiezellen exprimiert werden können. Daher kann ein Antagonist der PTP-HSCs der vorliegenden Erfindung zur Induktion der Differenzierung von undifferenzierten Leukämiezellen verwendet werden. Dies könnte ermöglichen, dass aggressive undifferenzierte Leukämiezellen differenziert werden, was wiederum deren Behandlung erleichtert.

[0154] PTP-HSC-Antagonisten können ferner zur Induktion der Differenzierung von hämopoetischen Stammzellen verwendet werden. Da die Hemmung des nativen PTP-HSC-Enzyms die Differenzierung von Vorläuferzellen induzieren kann, könnte ein Antagonist von PTP-HSC als Paninduktor der myeloiden, erythroiden und lymphoiden Produktion fungieren. Diese Verwendung von PTP-HSC-Antagonisten kann die Notwendigkeit der Verwendung von Stammzellwachstumsfaktoren umgehen oder verringern.

[0155] Weitere Einzelheiten der Erfindung werden in den folgenden, nicht beschränkenden Beispielen erläutert.

Beispiel 1

Identifizierung und Klonierung von muriner PTP-HSC

A. Materialien und Verfahren

Isolierung von embryonalen $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-hämopoetischen-Stammzellen.

[0156] Dottersäcke oder Embryos wurden aus zeitlich abgestimmten trächtigen Weibchen am Tag 10,5 herausseziert. Fetale Leber wurden aus Embryos von 13,5 – 14 Tagen isoliert. Dottersack- und Embryogewebe wurde mit 1 % Collagenase in RPMI-Medium bei 37 °C 15 min dissoziiert. Die Zellen wurden des Weiteren durch zwei Passagen durch eine 16er Nadel dissoziiert. Fetale Leber wurde nur durch Passage durch eine 16er Nadel dissoziiert. Anhaftende Zellen wurden durch Über-Nacht-Inkubation an Kunststoff befestigt, wonach die nichthaftenden hämopoetischen Zellen mit einem Abstammungscocktail von Antikörpern (1 µg von jeweils TER 119, Gr-1, Ly-1, Transferrinrezeptor und B220) 1 h auf Eis inkubiert wurden. Die Zellen wurden gewaschen und die abstammungspositiven Zellen wurden unter Verwendung von magnetischen Perlen und einer Miltenyi-Säule abgereichert. Abstammungsnegative Zellen wurden pelletiert, in 2 % FCS, PBS resuspendiert und mit Kaninchen-anti-Maus-CD34-Antikörper (Baumhueter et al., Science 262, 436-38 [1993]) 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dreimal in 2 % FCS, PBS gewaschen, in dem gleichen Puffer resuspendiert und mit konjugiertem Esel-anti-Kaninchen-FITC-Antikörper und in einigen Fällen PE-konjugiertem Anti-Sca-Antikörper 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal mit 2 % FCS, PBS gewaschen und dann durch Zellsortierung auf einem ELITE-Zellsortierer isoliert.

[0157] PCR-Analyse von mRNA, die aus $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-hämopoetischen-Stammzellen isoliert wurde.

[0158] Messenger-RNA wurde aus der $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-Fraktion von hämopoetischen Zellen von fetalem Dottersack isoliert (Micro-FastTrack, InVitrogene). Poly A + RNA wurde mit Zufallshexameren (Promega) und Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (SuperScript II, GIBCO BRL) revers transkribiert. 1/4 dieser cDNA wurde mittels PCR unter Verwendung entarteter gemischter Oligonucleotidprimer amplifiziert. Sense- und Antisense-Primer, die den Konsensus-PTP-Aminosäuresequenzen $^{H}/_{D}FWRM^{I}/_{V}W$ (5' -$A^{C}/_{T}TT^{C}/_{T}TG$-$G^{A}/_{C}GIATG^{A}/_{G}TITGG$-3') (SEQ ID NO: 14, wobei die entarteten Positionen durch "N" bezeichnet sind) bzw. $WPD^{F}/_{H}GVP$ (5'-$GGIAC^{G}/_{A}T/_{A}G/_{A}G/_{A}TCIGGCCA$-3') (SEQ ID NO: 15, wobei die entarteten Positionen durch "N" bezeichnet sind) entsprachen, wurden verwendet. PCR wurde in 1X Taq-DNA-Polymerasepuffer (GIBCO BRL) plus 0,2 mM von jedem dNTP, 10 % DMSO und 5 Einheiten Taq-Polymerase (GIBCO BRL) während 25 Zyklen von 94 °C während 1 min, 55 °C während 1 min und 72 °C während 1 min durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit Klenow-Enzym (New England Biolabs) bei 30 °C während 30 min behandelt, in die SmaI-Stelle des Plasmids pRK-5 (EP 307247, veröffentlicht am 15. März 1989) kloniert und anschließend sequenziert (Sequenase, USB).

cDNA- und Genomklonierung.

[0159] Adapterverknüpfte Doppelstrang-cDNA wurde aus A + RNA von Mausembryos von 10 Tagen (Marathon-ready cDNA Synthesize Kit, Clontech) unter Verwendung eines entweder Zufallshexamer- oder Oligo-dT-Primers hergestellt. cDNA voller Länge wurde durch 5'- oder 3'-Schnellamplifikation von cDNA-Enden (RACE) der Marathon-ready-cDNAs isoliert. Genomklone mit Codierung für das PTP-HSC-Gen wurden unter Verwendung von Standardtechniken isoliert. Die plaquegereinigte λ-Phagen-DNA wurde mit Not 1 verdaut und das Insertionsfragment wurde ohne Reinigung direkt in durch Not 1 verdautes Bluescript kloniert. Exons wurden unter Verwendung einer Kombination von Restriktionsverdau und Southern Blotting sowie DNA-Sequenzierung unter Verwendung von Kundenprimern markiert.

Bakterienexpression der PTP.

[0160] cDNA-Sequenzen, die die Aminosäuren 8 bis 323 codieren, die die Phosphatasedomäne enthalten, wurden mittels PCR unter Verwendung des Sense-Oligomers 5'-CACGGTCGACGGTGAGGAG-CTTCTTTGAGCAGCTGGAGG-3' (SEQ ID NO: 3) und Antisense-Oligomers 5'-GTTGCGGCCGCGATTG-GAGCGCAGTTCTCCTTGAGGTTCTGG-3' (SEQ ID NO: 4) erhalten. Das PCR-Fragment wurde mit SalI- und NotI-Restriktionsenzym behandelt und in das SalI- und NotI-verdaute pGEX-4T-I-Plasmid (Pharmacia) kloniert. Das Fusionsprotein wurde unter Verwendung einer Glutathionsepharosesäule (Pharmacia) affinitätsgereinigt. Tyrosinphosphataseassays an dem GST-Fusionsprotein wurden nach dem Verfahren des Herstellers unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Tyrosin-phosphorylierten Peptiden aus einem Tyrosin Phosphatase

Assay Kit (Boehringer Mannheim) durchgeführt.

Quantitative PCR-Analyse von aus hämopoetischen Zellen isolierter RNA.

[0161] cDNA wurde aus $^{+}$RNA durch reverse Transkription (RT) mit Zufallshexamer hergestellt. PCR wurde dann zur quantitativen Amplifikation von PTP-HSC-cDNA und, als interner Standard, Triosephosphatisomerase(TPI)-cDNA verwendet. Für jede PCR wurden 6 µl der 20 µl RT-Reaktion auf 50 µl derart gebracht, dass sie 0,3 mM dNTPs, 4µCi von ^{32}P-dATP (3000 Ci/mmol, Amersham), 100 pmol von jedem der vier Primer und 5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase (GIBCO BRL) enthielten. 17 PCR-Zyklen von 94 °C während 50 s, 55 °C während 50 s und 70 °C während 70 s. Ein Zehntel von jeder der PCR-Proben wurde in einem 6 % Polyacrylamidgel einer Elektrophorese unterzogen und die PCR-Produkte wurden durch Phosphorimaging (Fuji) quantitativ bestimmt. Die Bedingungen für eine akkurat genaue quantitative Bestimmung von entweder PTP-HSC oder TPI wurden in Experimenten, die Reihenverdünnungen einer Standardzubereitung von A^{+} RNA von 32D-Zellen verwendeten, um für jedes Primerpaar die Zeiten der Primerrenaturierung und Primerverlängerung und die Zyklen, die eine lineare Korrelation zwischen der Menge von Templat-RNA und dem PCR-Produkt ergaben, zu bestimmen, getestet. Unter den letztendlich gewählten PCR-Bedingungen wurde eine bestimmte Menge von Proben-RNA gleichzeitig mit Reihenverdünnungen der Standard-RNA und einer negativen Kontrolle von reverser Transkriptase analysiert.

Northern Blot-Analyse von Geweben und Zelllinien.

[0162] Ein SalI-NotI-1,3-kb-PTP-HSC-cDNA-Fragment wurde zur Sondierung eines Northern Blot von Mausmehrfachgewebe verwendet (Clontech). Der gleiche Northern Blot wurde mit verschiedenen anderen Sonden, die alle detektierbare, nicht abgebaute Transkripte zeigten, verwendet.

PCR-Primer-Paare

5'-RACE-Primer: Antisense-Primer
5'-CCTGGAGGGTCCTGAGAGTGATGTCTGCATTCAGTG-3' (SEQ ID NO: 5),
5'-CCTCTTGGAGCAGGGAAAGGATGACTCTTGTCTC-3' (SEQ ID NO: 6),
5'-CAGCTGCTCCAAGAAGCTCCTCACCAAGTC-3' (SEQ ID NO: 7).
Sense-Primer: AP1 und AP2 (Clontech).
3'-RACE-Primer: Sense-Primer
5'-GGTAGAGGTGGGCAGGGTGAAGTGTTCTCGC-3' (SEQ ID NO: 8),
5'-CACTGAATGCAGACATCACTCTCAGGACCCTCCAGG-3' (SEQ ID NO: 9),
5'-GAGACAAGAGTCATCCTTTCCCTGCTCCAAGAGG-3' (SEQ ID NO: 10).
Antisense-Primer: AP1 und AP2 (Clontech).
Quantitative RT-PCR-Primer: PTP-HSC-Sense-Primer: 5'-CACTGAATGCAGACATCACTCTCAGGACCCTCCAGG-3' (SEQ ID NO: 9),
Antisense-Primer 5'-GAATGGTAACCTGGAGGGTCCTGAG-3' (SEQ ID NO: 11).
TPI-Sense-Primer 5'-GAGAAGGTCGTGTTCGAG (SEQ ID NO: 12),
Antisense-Primer 5'-GTGTACTTCCTGTGCCTG-3' (SEQ ID NO: 13).

B. cDNA-Klonierung von PTPs von hämopoetischen Stammzellen

[0163] Um potentiell an der Beibehaltung der hämopoetischen Stammzelle beteiligte PTPs zu analysieren, isolierten wir eine hochgereinigte Population dieser Zellen aus entweder dem murinen, 10,5 Tage alten Dottersack oder Embryo. Wir zeigten bereits, dass sowohl Vorläuferaktivität als auch Stromazellenrepopulationsaktivität in der CD34^{hi}-Fraktion dieser Embryozellen ermittelt wurde [3] (C. Fennie und L. Lasky – unveröffentlichte Beobachtungen). Ferner zeigten andere, dass die aus Knochenmark isolierte murine CD34^{hi}-Population (Krause et al., Blood 84(3), 691-701 [1994]) oder fetaler Leber isolierte murine CD34^{hi}-Population (Ziegler et al., Blood 84, 2422-2450 [1994]) Stammzellen mit der Fähigkeit zur Wiederherstellung letal bestrahlter Tiere enthält. Um eine stärker gereinigte Fraktion dieser Vorläuferzellen zu isolieren, arbeiteten wir eine Abstammungsabreicherungsstufe sowie eine positive Selektionsstufe mit dem Sca-Antikörper (Uchida et al., Blood 83(12), 3758-3779 [1994]) zusätzlich zu dem CD34-Antikörper ein. Diese morphologisch primitiven hämopoetischen Zellen zeigen einen höheren Grad an Stromazellenrepopulationsfähigkeit sowie Pflastersteinbildung im Vergleich zu den früher beschriebenen CD34^{hi}-Vorläuferzellen und wir untersuchen derzeit deren in-vivo-Repopulationsaktivität (C. Fennie und L. Lasky – unveröffentlichte Beobachtungen). Frühere Forscher zeigten, dass die lin^{lo}Sca^{hi}-Fraktion von hämopoetischen Zellen des Knochenmarks einen hohen Grad an Repopulationsaktivität aufweist (Sprangrude et al., Science 241, 58-62 [1988]). Daher ist es wahrscheinlich, dass die aus dem

frühen Embryo isolierten $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-Zellen selbsterneuernde hämopoetische Stammzellen enthalten (Uchida et al., aaO; Krause et al., aaO; Ziegler et al., aaO).

[0164] Konsensus-PCR unter Verwendung von Primern, die von zwei hoch konservierten Regionen der PTP-Phosphatasedomäne stammten, führten zur Klonierung und Sequenzierung ~70 PCR-Fragmenten. Wie in Tabelle 1 gezeigt ist, wurden eine Vielzahl bekannter Rezeptor- und Nichtrezeptor-PTPs in dieser Fraktion dieser Vorläuferzellen detektiert und viele dieser PTPs wurden in der hämopoetischen Stammzellabteilung zuvor nicht beschrieben. Zwei neue PTPs (in der Tabelle als PTP 38 und PTP 49 bezeichnet) wurden ebenfalls isoliert. Eine ist eine Rezeptor-PTP, die mit der homotyp wechselwirkenden μ-, κ- und LAR-Familie verwandt ist und der Gegenstand einer gleichzeitig mit dieser eingereichten Patentanmeldung ist. Von der zweiten PTP wurde ermittelt, dass sie sehr homolog zu zwei früher beschriebenen Nichtrezeptor-PTPs ist, der murinen PTP-PEP (Matthews et al., Mol. Cell Biol. 12(5), 2396-2405 [1992]) und der murinen/humanen PTP-PEST (Takekawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 189(2), 1223-1230 [1992]; Yang et al., J. Biol. Chem. 268(23) 17650 [1993]; und Charest et al., Biochem. J. 308(2), 425-432 [1995]), die beide eine Region enthalten, die sehr reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin ist (die "PEST"-Domäne). Für eine dieser PTPs, PEP, wurde gezeigt, dass sie im Nucleus lokalisiert ist (Flores et al., aaO) (siehe im Folgenden), weshalb man der Meinung war, dass das neue PTP-Fragment ein neues Mitglied dieser potentiell nukleär lokalisierten PTP-Familie sein kann.

[0165] Zunächst PCR- und Northern-Analysen mit dem PTP-Fragment ergaben, dass das Transkript mit Codierung für dieses Enzym in Embryo- und Erwachsenengeweben äußerst selten ist. Daher wurde die cDNA voller Länge unter Verwendung des RACE-Verfahrens kloniert und RNA aus 10 Tage alten Embryos isoliert. Da die RACE-Klonierung der 5'-Region besonders schwierig war, wurde die 5'-Endsequenz unter Verwendung des Genomklons mit Codierung für diese PTP festgestellt. Wie in **Fig.** 1 ersichtlich ist, codiert dieses Transkript ein offenes Leseraster mit 453 Aminosäuren, die ein Protein eines Molekulargewichts von 50253 Dalton spezifizieren. Homologierecherchen ergaben, dass die Region mit Codierung für die Aminosäuren 25 – 290 sehr stark homolog zu einer Vielzahl von PTPs war, wobei der höchste Grad an Homologie mit muriner PTP-PEP (Matthews et al., aaO) und muriner/humaner PTP-PEST (Takekawa et al., aaO; Yang et al., aaO; und Charest et al., aaO) bestand (**Fig.** 2). Interessanterweise wurde auch ermittelt, das PTP-PEP in reifen hämopoetischen Zellen exprimiert wird (Matthews et al., aaO, Flores et al., aaO), obwohl humane und murine PTP-PEST ein stärker generalisiertes Expressionsmuster zu besitzen scheinen (Yang et al., aaO; Charest et al., aaO). Wie bei diesen zwei früher beschriebenen PTPs gezeigt wurde, enthält die hier berichtete neue PTP eine Region 3' der PTP-Domäne, die sehr reich an Prolin, Serin und Threonin ist (~29 %) (eingerahmte Reste in **Fig.** 1). Dieser Region fehlt eine andere signifikante Homologie mit den PTPs PEP und PEST und sie ist auch viel kürzer in der hier beschriebenen neuen PTP. Schließlich ist eine kurze Region von 20 Aminosäuren am letzten Carboxyende des Proteins zu ähnlichen carboxyterminalen Regionen in den PTPs PEP und PEST stark homolog (**Fig.** 2). Diese Region ist reich an basischen Resten und es wurde gezeigt, dass der homologe Bereich in PTP-PEP an der Lokalisierung dieses Enzyms im Kern beteiligt ist (Flores et al., aaO). Diese Region enthält jedoch auch zwei negativ geladene Reste (Pfeilspitzen in **Fig.** 2), weshalb es wahrscheinlich ist, dass diese neue PTP ein im Cytoplasma lokalisiertes Enzym ist, was für PTP-PEST gezeigt wurde (Charest et al., aaO). Schließlich enthält die hier beschriebene neue PTP einen Serinrest an Position 37 (in **Fig.** 2 mit Stern angegeben), der in allen drei Mitgliedern dieser Familie konserviert ist und von dem gezeigt wurde, dass er in PTP-PEST durch die Proteinkinasen C und A phosphoryliert wird (Garton und Tonks, EMBO J. 13 (16), 3763-71 [1994]). Interessanterweise ist eine erhöhte Phosphorylierung an dieser Stelle für die PTPase-Aktivität dieser PTP hemmend (Banville et al., Genomics 27(1), 165-173 [1995]). Zusammenfassend gesagt, scheint die hier beschriebene neue PTP ein neues Mitglied einer Familie von Nichtrezeptor-PTPs zu sein, die P-, S- und T-reiche Regionen enthalten (**Fig. 3**). Ferner enthalten alle drei dieser PTPs eine homologe carboxyterminale Region, von der gezeigt wurde, dass sie als nukleäres Lokalisierungssignal für eines der Familienmitglieder (PTP-PEP) funktioniert, obwohl für das murine PEST-Enzym ermittelt wurde, dass es im Cytoplasma lokalisiert wird.

[0166] Frühere Analysen der Genomstrukturen anderer PTPs legten nahe, dass diese Enzyme aus Genen, die eine große Zahl von Introns enthalten, konstruiert wurden. Dies scheint auch für das hier beschriebene neue PTP der Fall zu sein. Wie aus **Fig. 4** ersichtlich ist, wird das PTP-Gen einer hämopoetischen Vorläuferzelle durch 14 Introns unterteilt. Eine Analyse der Intronstruktur dieser neuen PTP im Vergleich mit der für andere PTPs gefundenen legt nahe, dass das neue Vorläuferzellenzym in eine vergleichbare Zahl codierender Exons unterteilt ist (beispielsweise Banville et al., aaO). Ferner scheint, wie im Folgenden beschrieben wird, mindestens ein weiteres kleineres Transkript sowie eine heterogene Sammlung großer Transkripte vorhanden zu sein, was nahelegt, dass alternatives Spleißen in diesem Gen erfolgen kann. Ferner belegten Chromosomlokalisierungsuntersuchungen, dass das Gen mit Codierung für die humane Form dieser PTP auf Chromosom

14 gefunden wird (D. Dowbenko und L. Lasky, unveröffentlichte Daten).

[0167] Obwohl die Sequenz der N-terminalen PTP-Domäne viele der konservierten Aminosäuren enthielt, von denen ermittelt wurde, dass sie für Substraterkennung und Tyrosindephosphorylierung von entscheidender Bedeutung sind (Jia et al., aaO), war es wichtig, aufzuzeigen, dass diese Sequenz tatsächlich eine aktive PTP-Domäne codierte. Hierfür produzierten wir ein Konstrukt unter Verwendung des Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionssystems, das die von dem neuen cDNA-Klon abgeleitete gesamte PTP-homologe Region enthielt. Das Protein wurde aus induzierten Bakterienkulturen isoliert und es wurde auf die Dephosphorylierung von Tyrosin unter Verwendung von zwei verschiedenen phosphorylierten Peptiden getestet (siehe Materialien und Verfahren). Wie aus **Fig. 5** ersichtlich ist, hatte das isolierte GST-PTP-Domänenfusionsprotein einen sehr hohen Grad der PTP-Aktivität mit signifikanter Dephosphorylierung bei nur 20 Picogramm Enzym pro Reaktion, die partiell gegenüber einer Hemmung durch Orthovanadat empfindlich war. Die nur partielle Hemmung der Enzymaktivität durch Orthovanadat beruhte wahrscheinlich auf dem hohen Aktivitätsgrad als auch unzureichenden Inhibitorkonzentrationen. Diese Daten zeigen, dass diese PTP hämopoetischer Vorläuferzellen eine aktive Tyrosinphosphatase ist.

C. Expression des PTP-Transkripts der Vorläuferzelle

[0168] Die Isolierung der neuen PTP aus der $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-Population hämopoetischer Stammzellen legte nahe, dass diese PTP für sehr frühe Vorläuferzellen spezifisch sein könnte. Wie **Fig. 6a** erläutert, zeigte eine quantitative PCR, die die Mengen des Transkripts mit Codierung für diese PTP in der $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-Population, einer stark undifferenzierten Population, die hämopoetische Stammzellen enthält (Spangrude et al., aaO; Krause et al., aaO; Zeigler et al., Blood 84 (8), 2422-2430 [1994]), mit der $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{lo}$-Population, einer stärker differenzierten Zellpopulation (Spangrude et al., aaO), die entsprechende Vorläufer enthält, verglich, dass eine etwa zehnfach niedrigere Menge des Transkripts in den stärker differenzierten Sca^{lo}-Zellen vorhanden war. Um zu untersuchen, ob diese Herunterregelung mit dem Fortschreiten der Differenzierung fortgesetzt wurde, wurde quantitative PCR unter Verwendung von RNA, die aus Suspensionskulturen von $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-Zellen, die IL-1, IL-3, EPO und GM-CSF während verschiedener Zeiträume in Abwesenheit von Stromazellen ausgesetzt wurden, isoliert wurde, durchgeführt. Die Analyse der Zellzahlen zusammen mit Wright-Giemsa-Rnfärbung der Kulturen ergab, dass die undifferenzierte $lin^{lo}CD34^{hi}Sca^{hi}$-Zellpopulation in Gegenwart dieser Wachstums- und Differenzierungsfaktoren drastisch expandierte und auch eine Metamorphose längs des myeloiden Pfads erfolgte, wobei letztendlich Kulturen erhalten wurden, die nach 14 Tagen vorwiegend Makrophagen enthielten (Daten nicht gezeigt). Wie **Fig. 6b** erläutert, verschwindet das Transkript mit Codierung für die neue PTP, wenn die Zelle repliziert und sich entwickelt, und es ist nach etwa 7 Tagen Kultur vollständig abwesend. Diese Daten sind mit einer Rolle für diese PTP in frühen Stamm- oder Vorläuferzellen, jedoch nicht in den reifen entsprechenden Zellpopulationen konsistent.

[0169] Die potentielle Bedeutung dieser PTP speziell für das hämopoetische System ist in **Fig. 7A** erläutert, wo Northern Blot-Analysen verschiedener Gewebe und Zelllinien angegeben sind. Wie aus dieser Figur ersichtlich ist, scheint das Transkript in den Embryoproben nicht detektierbar zu sein und es wird in Lunge und Niere von ausgewachsenen Tieren in ausnehmend niedrigen Mengen exprimiert. Daher müssen, obwohl hämopoetische Stammzellen im Embryo klar vorhanden sind, diese so selten sein, dass keine direkte Detektion des Transkripts mit Codierung für die neue PTP möglich ist. Besonders interessant ist das Fehlen eines Signals in der RNA, die aus der Erwachsenen-Milz isoliert wurde, einem hämopoetischen Kompartiment, das vorwiegend reife differenzierte hämopoetische Zellen enthält und von dem früher gezeigt wurde, dass es PTP-PEP exprimiert (Matthews et al., aaO). Die in der Lunge detektierten sehr schwachen Transkripte wurden durch nichtquantitative PCR-Analyse festgestellt (J. Cheng und L. Lasky – unveröffentlichte Daten). Jedoch sind die Transkripte in der Lunge sehr selten und können fehlerhaft sein, da das Screening einer Bibliothek von Erwachsenen-Lunge (1×10^6 Klone) zu nur zwei positiven Isolaten führte, die beide Introns enthielten (J. Cheng und L. Lasky – unveröffentlichte Beobachtungen).

[0170] Das Fehlen eines detektierbaren Signals in den meisten Geweben des Erwachsenen und Embryos, gekoppelt mit der Identifizierung des Transkripts in der hoch gereinigten Stammzellpopulation, jedoch nicht in den differenzierten hämopoetischen Zellen, legte nahe, dass diese PTP in hämopoetischen Vorläuferzelllinien exprimiert werden könnte. Wie **Fig.** 7B erläutert, sind die Transkripte mit Codierung für diese neue PTP in den drei verschiedenen murinen hämopoetischen Vorläuferzelllinien, die durch sowohl Northern- als auch PCR-Analysen getestet wurden, ohne weiteres detektierbar. In allen drei Fällen stellen diese Linien relativ undifferenzierte Vorläufer reifer hämopoetischer Zellen dar, obwohl sie sicherlich keine selbsterneuernden Stammzellen sind. Die Zellen scheinen zwei Haupttranskripte zusätzlich zu einer Vielzahl kleinerer Transkripte zu codieren. Ein Haupttranskript ist eine RNA von ~1,8 kb, die dem oben beschriebenen cDNA-Klon entspricht,

während das andere eine RNA von ~0,7 kb codiert, die noch zu charakterisieren ist. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass dieses kleinere Transkript auf alternativem Spleißen beruht, da, wie oben beschrieben, das Gen mit Codierung für diese PTP in eine große Zahl von Exons geteilt ist (Fig. 4). Fig. 7C erläutert, dass das PTP-HSC-Transkript durch PCR in einem differenzierten T-Zellklon nicht detektierbar ist, ein Ergebnis, das erneut mit der Herrunterregulation dieser PTP indifferenzierten Zellen konsistent ist. Schließlich ergab die PCR-Analyse verschiedener humaner Zelllinien unter Verwendung des murinen Primerpaars die Expression eines Fragments einer ähnlichen Größe in humanen CMK-Vorläuferzellen, und die Sequenz dieses PCR-Fragments zeigte, dass das humane Homologon mit der murinen PTP hoch konserviert ist (J. Cheng, Kai Wu und L. Lasky – unveröffentlichte Ergebnisse). Zusammengefasst gesagt, scheint die hier beschriebene neue PTP vorwiegend in sehr frühen hämopoetischen Vorläuferzellen exprimiert zu werden, was mit einer potentiellen Rolle bei der Regulation des Differenzierungszustands dieser Zellen konsistent ist.

D. Diskussion

[0171] Die Fähigkeit der hämopoetischen Stammzelle zur Selbsterneuerung bei Abwesenheit einer Differenzierung ist ein wichtiger Faktor, der es dieser Zelle ermöglicht, eine große Zahl von Nachkommen während der Lebensdauer des Organismus zu liefern. Das Beibehalten des undifferenzierten Zustands muss gleichzeitig mit der Replikation der Stammzelle erfolgen, da dieser Zelltyp kontinuierlich ergänzt werden kann muss. Daher müssen spezielle Mechanismen vorhanden sein, die einige Aspekte der Zellaktivierung, wie Differenzierung, ohne die Beeinflussung anderer, wie die Teilung, verringern. Da Tyrosinphosphorylierung ein kritischer Aspekt der Zellaktivierung ist, ist es auf der Basis der hier offenbarten Ergebnisse wahrscheinlich, dass verschiedene Mechanismen, die die Tyrosinphosphorylierung regulieren, an der Beibehaltung der sich selbst erneuernden Stammzelle beteiligt sind. Eine derartige Spezifität kann teilweise durch die Expression geeigneter Wachstumsfaktoren durch das Stroma hämopoetischer Zellen erreicht werden. Jedoch ist ein anderes Mittel, durch das eine derartige Regulation erfolgen kann, die Dephosphorylierung eines Teilsatzes von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen. Ein Mechanismus, der eine spezifische Dephosphorylierung ermöglichen könnte, erfolgt über PTPs, die nur einen Teil der Tyrosin-phosphorylierten Proteine in der Zelle erkennen. Daher könnte die Analyse von PTPs, die durch hämopoetische Stammzellen exprimiert werden, unser Verständnis der Mechanismen, durch die die Stammzellenselbsterneuerung erhalten wird, weiter fördern. Die in der vorliegenden Anmeldung beschriebene Nichtrezeptor-PTP weist einige der Merkmale auf, die für einen Regulator der Stammzelldifferenzierung erwartet werden könnten.

[0172] Mehrere Aspekte dieser neuen PTP, die durchgängig durch die Beschreibung und Ansprüche als die PTP von hämopoetischen Stammzellen oder PTP-HSC bezeichnet wird, sind mit einer Rolle bei der Regulation von Aspekten der Biologie von frühen hämopoetischen Vorläuferzellen konsistent. Erstens ist die spezifische Expression des Transkripts in sehr frühen hämopoetischen Vorläuferzellen zusammen mit der Herunterregulation der Botschaft, wenn die Zellen differenzieren, mit einer Rolle für dieses Enzym in physiologischen Aspekten der weniger differenzierten Stammzelle kompatibel. Während im Hinblick auf die Regulation von Genen in sehr frühen hämopoetischen Vorläuferzellen sehr wenig verstanden ist, legt die offensichtlich singuläre Expression dieses Gens vorwiegend in diesen vergleichsweise undifferenzierten Zellen nahe, dass neue Mechanismen der Transkriptionsregulation bei der Kontrolle dieses Locus genutzt werden könnten (Orkin, Curr. Opin. Cell Biol. 7(6), 870-877 [1995]). Ferner ist der vorherrschende Mangel an Expression dieser PTP in den meisten Erwachsenengeweben mit Ausnahme von extrem niedrigen Mengen in Lunge und Niere auch mit einer Rolle für dieses Enzym spezifisch innerhalb des Kompartiments hämopoetischer Vorläuferzellen konsistent. Dies steht in starkem Kontrast zur Expression von PTP-PEP, die im lymphoiden Kompartiment gefunden wird (Takekawa et al., aaO), und PTP-PEST, die offensichtlich ubiquitär in einer Zahl von Zelllinien und Geweben exprimiert wird (Yang et al., aaO). Zweitens kann die PTP-Domäne als Moderator der Zellaktivierung aufgrund von deren Fähigkeit zur Dephosphorylierung von Tyrosinresten angedacht werden. Die Tyrosinphosphorylierung kann die Aktivitäten verschiedener Proteine entweder hoch- oder herunterregulieren (Fantl et al., aaO), so dass die PTP-HSC einen speziellen Teilsatz von Tyrosinphosphorylierten Proteinen aktivieren oder hemmen kann. In einer Zelle, die eine Herunterregulation der Differenzierung erfordert, würde diese Art einer spezifischen Modulation die Kontrolle der Phosphotyrosinkonzentrationen von Proteinen, die durch verschiedene, durch das hämopoetische Stroma produzierte Wachstumsfaktoren aktiviert werden, ermöglichen. Zusammen sind diese Daten mit einer Funktion für dieses Enzym bei der Modulation der Entwicklung der Stammzelle, die durch die durch die hämopoetische Mikroumgebung produzierten Wachstumsfaktoren induziert wird, kompatibel.

[0173] Die Hypothese, dass PTPs, wie PTP-HSC, an der Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustands in der hämopoetischen Stammzelle beteiligt sind, legt Möglichkeiten im Hinblick auf die durch diese Art von PTP erkannten Substrate nahe. Mehrere der Substrate für die PTPs wurden bisher charakterisiert. Beispiels-

weise wurde ermittelt, dass α-PTP, eine Rezeptor-PTP, die Grade der src-Tyrosin-Phosphorylierung, die zur Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen führt, reguliert. Lar sowie CD45 sind offensichtlich an der Regulation der Tyrosinphosphorylierungsgrade des Insulinrezeptors beteiligt (Kulas et al., J. Biol. Chem. 271(2), 748-754 (1996); Kulas et al., J. Biol. Chem. 271(2), 755-760 [1996]). Im Hinblick auf die Hämatopoese wurde gezeigt, dass die die SH-2-Domäne enthaltende PTP-1C-Phosphatase entscheidend an der Regulation der myeloiden Entwicklung der "mottenzerfressenen" Maus sowie dem Aktivierungszustand des EPO-Rezeptors beteiligt ist (Schulz et al., aaO; McCulloch (Klingmuller et al., aaO). Ferner wurde ermittelt, dass eine andere, SH2 enthaltende PTP, PTP 1D, die Aktivität des Prolaktinrezeptors positiv reguliert (Ali et al., EMBO J. 15(1), 135-142 [1996]). Diese Beispiele sind unter anderen konsistent mit einer Rolle für im Cytoplasma lokalisierte PTP-Domänen bei der Regulation einer Vielzahl von Zellprozessen. Jedoch ist die Natur der durch die seltenere nukleäre PTP-Familie erkannten Substrate unbekannt. Die durch den cdc25-Locus codierte Phosphatase zweifacher Spezifität (d. h. Tyrosin- und Serin/Threonin-Dephosphorylierung) ist ein nukleäres Enzym, das für die Regulation der Mitose entscheidend ist (Gautier et al., Cell 67(1), 197-211 [1991]). Ferner scheint PAC-1, eine weitere nukleär lokalisierte PTP, an der Regulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen beteiligt zu sein. Eine vor kurzem beschriebene Phosphatase zweifacher Spezifität, TYP 1, die mit der VH-1-Phosphatase des Vaccinia-Virus verwandt ist, scheint an der Regulation von sowohl der ERK- als auch JNK-Familie von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen beteiligt zu sein (King et al., Oncogene 11, 2553-2563 [1995]). Diese Daten legen nahe, dass mehrere derzeit beschriebene Phosphatasen Rollen bei der Regulation von Tyrosin-phosphorylierten nukleären Proteinen spielen.

[0174] Ein weiteres mögliches Substrat für sowohl die nukleären als auch die cytoplasmatischen PTP-Enzyme sind die STAT-Proteine. Diese Transkriptionsaktivatoren umfassen eine Familie von mindestens 6 verschiedenen Mitgliedern, die alle durch die JAK-Tyrosinkinasen aktiviert werden (Darnell et al., Science 264(5164), 141501421 [1994]; Ihle et al., Annu. Rev. Immunol. 13, 369-398 [1995]). Die JAK-Phosphorylierung wird durch die Bildung von Rezeptorkomplexen, die durch die Bindung von verschiedenen hämopoetischen und anderen Wachstumsfaktor ähnlichen Molekülen stimuliert werden, stimuliert (Darnell et al., aaO). Die phosphorylierten STAT-Proteine dimerisieren dann, wandern zum Nucleus und binden spezifisch an verschiedene DNA-Elemente, die die Transkription von Wachstums- und Differenzierungsgenen regulieren (Shuai et al., Science 261(5129), 1744-1746 [1993]; Heim et al., Science 267(5202), 1347-49 [1995]). Daher ergeben diese Transkriptionsfaktoren, da sie mit der Aktivierung von hämopoetischen Differenzierungsfaktoren verknüpft sind, Ansprechziele für negative Regulation in hämopoetischen Stammzellen. Das absolute Erfordernis der Tyrosinphosphorylierung dieser Transkriptionsaktivatoren legt daher nahe, dass die hier berichtete neue PTP die STAT-Aktivierung über die Dephosphorylierung von Tyrosinresten regulieren könnte. Auf diese Weise könnte die Hochregulation von für den differenzierten Zustand spezifischen Genen durch die Dephosphorylierung von einem oder mehreren aktivierten STAT-Molekülen gehemmt werden. Diese Hypothese ist im Falle von hämopoetischen Stammzellen besonders ansprechend. In diesem Fall könnte die Aktivierung der STAT-Proteine durch die Bindung von verschiedenen hämopoetischen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, ein Zustand, der die terminale Differenzierung induziert, durch eine stammzellspezifische PTP, wie PTP-HSC, herunterreguliert werden. Wenn diese Hypothese korrekt ist, muss die Art und Weise, durch die spezifische STAT-Dephosphorylierung erfolgt, untersucht werden. Es ist jedoch möglich, dass die an Prolin, Serin, Threonin reiche Domäne von PTP-HSC derart funktioniert, dass sie nur an einen Teilsatz von STATs bindet.

[0175] Schließlich zeigten jüngere Daten, dass PTP-PEST mit den $p52^{shc}$- und $p66^{shc}$-SH2 enthaltenden Adapterproteinen in einer von Proteinkinase C abhängigen Weise assoziieren kann (Habib et al., J. Biol. Chem. 269(41), 25243-25246 [1994]). Diese Assoziation erfolgte durch eine Wechselwirkung zwischen der N-terminalen Region von SHC und der carboxyterminalen P-, S-, T-reichen Region der PTP-PEST. Die Tatsache, dass diese Assoziation durch Proteinkinase C verstärkt wurde, legte nahe, dass eine Serin- oder Threoninphosphorylierung beteiligt sein kann, und es ist bekannt, dass ein Serin in der P-, S-, T-reichen Region von PTP-PEST durch Proteinkinase C phosphoryliert wird (Garton und Tonka, aaO). Interessanterweise konnte Carbachol, ein Aktivator der G-Proteingekoppelten Signalisierung, ebenfalls diese Assoziation stimulieren, was nahelegt, dass PTP-PEST an dem Übersprechen zwischen G-gekoppelten und Tyrosinkinasepfaden beteiligt sein kann. Wegen der Ähnlichkeit von PTP-HSC gegenüber PTP-PEST schlagen wir vor, dass die neue PTP hämopoetischer Zellen der vorliegenden Erfindung auch mit SHC wechselwirken kann, und wir untersuchen derzeit diese Möglichkeit unter Verwendung des Hefe-Doppelhybridsystems.

[0176] Zusammenfassend gesagt, legen die in diesem Beispiel offenbarten Daten nahe, dass hämopoetische Stamm/Vorläuferzellen spezifisch eine PTP exprimieren, die herunterreguliert zu werden scheint, wenn die Zelle differenziert. Die PTP scheint überwiegend spezifisch für hämopoetische Vorläuferzellen zu sein, was eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung dieses Zellkompartiments nahelegt. Obwohl diese Daten potentiell wich-

tig sind, muss eine Zahl von Untersuchungen noch durchgeführt werden. Daher können die Möglichkeit, dass die STATs Substrate für dieses Enzym sind, die mögliche Wechselwirkung des Enzyms mit SHC, die konstitutive Expression des Enzyms in transfizierten Zellen und in transgenen Tieren und die Wirkungen von Nullmutationen an diesem Locus in vivo weitere Einsichten in die Mechanismen, durch die die Stammzellselbsterneuerung reguliert wird, ergeben.

Beispiel 2

Klonierung humaner PTP-HSC

[0177] Zwei Oligonucleotide (Sense: 5'ACTTGGTGAGGAGCTTCTTGGAGCAGCTGGAGG3' (SEQ ID NO: 20) und Antisense: 5'GGAATGTAACCTGGAGGGTCCTGA3' (SEQ ID NO: 21) wurden als PCR-Primer mit aus humanen CMK-hämopoetischen-Vorläuferzellen isolierter, revers transkribierter RNA verwendet. Die Bedingungen für PCR waren mit den in Beispiel 1 zur Isolierung des PCR-Fragments mit Codierung für murine PTP-HSC identisch. Das PCR-Fragment wurde in pBS (Bluescript)-Plasmid subcloniert und die DNA-Sequenz wurde gemäß der Beschreibung für die Maussequenz in Beispiel 1 bestimmt. Die partielle Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der humanen PTP-HSC sind in **Fig.** 8 gezeigt.

Beispiel 3

Expression der murinen und humanen PTP-HSC

[0178] Die nativen murinen PTP-HSC-Polypeptide werden in Säugerzellen unter Verwendung von Standardtechniken exprimiert. Kurz gesagt, wird ein DNA-Fragment mit Codierung für die gesamte PTP-HSC in einen Expressionsvektor (beispielsweise PRK5) ligiert. Der Expressionsvektor wird dann in Säugerzellen (beispielsweise Embryonieren-292-Zellen) transfiziert und die Proteinexpression wird unter Verwendung eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, der gegen die zu exprimierende native PTP-HSC gerichtet ist, bestimmt.

Tabelle 1

PTPs, die in $lin^{lo}CD34^{hi}$-hämopoetischen-Vorläuferzellen exprimiert werden

Name (Gen-Bank)	Häufigkeit (%)	Art
MMPRTYPHA	~27	Rezeptor, einzige katalytische Domäne
MUSC57B16A	~17	cytoplasmatisch, Bande-4.1-Homologie
MUSHCPA	~14	cytoplasmatisch, SH2-Domänen, hämopoetische Zellen
MMPTPNU3	~11	Rezeptor
MMMPTPPES	~4	cytoplasmatisch, pst-Domäne
MUSCPTP	~4	cytoplasmatisch
MUSPTPA	~4	Rezeptor, kappa, homophil wechselwirkend
MMTPBLR	~3	Rezeptor, Epithelzellen, Membranbindung
RNU28356	~3	cytoplasmatisch,
RATOSTP	~1	Rezeptor, FNIII-Domänen
MUSPTPRL 10	~1	cytoplasmatisch, Bande-4.1-Homologie
M60103	~1	Rezeptor, CD45
PTP-38 (neu)	~1	cytoplasmatisch, verwandt mit PST-Familie
PTP-49 (neu)	~1	Rezeptor verwandte μ/κ-Familie

Sequenzprotokoll

(1) Allgemeine Angaben:

(i) Anmelder: Genentech, Inc.

(ii) Bezeichnung der Erfindung: Proteintyrosin-phosphatasen

(iii) Anzahl der Sequenzen: 23

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adressat: Genentech, Inc.

(B) Straße: 460 Point San Bruno Blvd

(C) City: South San Francisco

(D) Staat: Kalifornien

(E) Land: USA

(F) ZIP: 94080

(v) Computerlesbare Fassung:

(A) Datenträger: 3,5 inch, 1,44 Mb Diskette

(B) Computer: IBM-PC-kompatibel

(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: WinPatin (Genentech)

(vi) Daten der jetzigen Anmeldung:

(A) Anmeldenummer:

(B) Anmeldetag:

(C) Klassifikation:

(vii) Angaben zu Anwalt/Vertreter:

(A) Name: Ginger R. Dreger

(B) Registrierungsnummer: 33055

(C) Aktenzeichen: P1010PCT

(ix) Telekommunikationsangaben:

(A) Telefon: 415/225-3216

(B) Telefax: 415/952-9881

(C) Telex: 910/371-7168

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 1:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 1529 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

CTCAGAGCGG GTCGCAGCAT GAGTCGCCAT ACGGACTTGG TGAGGAGCTT 50

CTTGGAGCAG CTGGAGGCCC GGGACTACCG GGAGGGGGCA ATCTTCGTTC 100

GTGAGTTCAG CGACATTAAG GCCCGCTCAG TGGCCTGGAA GTCTGAAGGT 150

GTGTGTTCCA CTAAAGCCGG CAGTCGGCTT GGGAACACGA ACAAGAACCG 200

CTACAAAGAT GTGGTAGCAT ATGATGAGAC AAGAGTCATC CTTTCCCTGC 250

TCCAAGAGGA GGGACATGGA AATTACATCA ATGCCAACTT CATCCGGGGC 300

ATAGATGGAA GCCAGGCCTA CATTGCGACG CAAGGACCCC TGCCTCACAC 350

ACTGTTGGAC TTCTGGCGCC TGGTTTGGGA GTTTGGGGTC AAGGTAATCC 400

TGATGGCCTG TCAAGAGACA GAAAATGGAC GGAGGAAGTG TGAACGCTAT 450

TGGGCCCGGG AGCAGGAGCC TCTAAAGGCT GGGCCTTTCT GCATCACCCT 500

GACAAAGGAG ACAACACTGA ATGCAGACAT CACTCTCAGG ACCCTCCAGG 550

TTACATTCCA GAAGGAATTC CGCTCTGTGC ACCAACTACA GTATATGTCC 600

TGGCCAGACC ACGGGGTTCC CAGCAGTTCT GATCACATTC TCACCATGGT 650

GGAGGAGGCC CGCTGCCTCC AAGGGCTTGG ACCTGGACCC CTCTGTGTCC 700

ACTGCAGTGC TGGCTGCGGA CGAACAGGTG TCCTGTGCGC TGTTGACTAT 750

GTGAGGCAGT TGCTGCTGAC CCAGACAATC CCTCCCAACT TCAGTCTCTT 800

CCAAGTGGTC CTGGAGATGC GGAAACAGCG GCCTGCAGCA GTGCAGACAG 850

AGGAGCAGTA CAGGTTCCTG TACCACACAG TGGCTCAGCT ATTCTCCCGC 900

ACTCTCCAGG ACACCAGCCC CCAATACCAG AACCTCAAGG AGAACTGCGC 950

TCCAATCTGC AAGGAAGCTT TCTCCCTCAG GACCTCCTCA GCCCTGCCTG 1000

CCACATCCCG GCCACCAGGA GGGGTTCTCA GGAGCATCTC GGTGCCTGCG 1050

CCCCCGACCC TCCCCATGGC TGACACTTAC GCTGTGGTGC AGAAGCGTGG 1100

CGCTTCGGCG GGCACAGGGC CGGGGCCGCG GGCGCCCACC AGCACGGACA 1150

CCCCGATTTA CAGCCAGGTG GCTCCACGTG CCCAGCGACC GGTGGCACAC 1200

ACGGAGGACG CACAGGGGAC AACGGCACTG CGCCGAGTTC CTGCGGACCA 1250

AAACTCTTCC GGGCCTGATG CCTACGAAGA AGTAACAGAT GGAGCACAGA 1300

CTGGAGGGCT AGGCTTCAAC TTGCGCATCG GAAGGCCCAA AGGGCCCCGG 1350

GATCCTCCAG CAGAGTGGAC ACGGGTGTAA CGAGTGCTGT GCCAGTTATA 1400

GCCTGCCACT CGGTGGTGGC TGGACTCCTG GAACCACCAT ACTGCTGTGC 1450

AGTGTGTTAT GTATGAGTGG GACTTGTGGG CCTGATTCAA AATAAAAGTT 1500

TCTCAGGGCG GAAAAAAAAA AAAAAAAAA 1529

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 2:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 453 Aminosäuren

(B) Art: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Arg His Thr Asp Leu Val Arg Ser Phe Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Glu Ala Arg Asp Tyr Arg Glu Gly Ala Ile Phe Val Arg Glu Phe
20 25 30

Ser Asp Ile Lys Ala Arg Ser Val Ala Trp Lys Ser Glu Gly Val
35 40 45

Cys Ser Thr Lys Ala Gly Ser Arg Leu Gly Asn Thr Asn Lys Asn
50 55 60

Arg Tyr Lys Asp Val Val Ala Tyr Asp Glu Thr Arg Val Ile Leu
65 70 75

Ser Leu Leu Gln Glu Glu Gly His Gly Asn Tyr Ile Asn Ala Asn
80 85 90

Phe Ile Arg Gly Ile Asp Gly Ser Gln Ala Tyr Ile Ala Thr Gln
95 100 105

Gly Pro Leu Pro His Thr Leu Leu Asp Phe Trp Arg Leu Val Trp
110 115 120

Glu Phe Gly Val Lys Val Ile Leu Met Ala Cys Gln Glu Thr Glu
125 130 135

Asn Gly Arg Arg Lys Cys Glu Arg Tyr Trp Ala Arg Glu Gln Glu
140 145 150

Pro Leu Lys Ala Gly Pro Phe Cys Ile Thr Leu Thr Lys Glu Thr
155 160 165

Thr Leu Asn Ala Asp Ile Thr Leu Arg Thr Leu Gln Val Thr Phe
170 175 180

Gln Lys Glu Phe Arg Ser Val His Gln Leu Gln Tyr Met Ser Trp
185 190 195

Pro Asp His Gly Val Pro Ser Ser Ser Asp His Ile Leu Thr Met
200 205 210

```
Val Glu Glu Ala Arg Cys Leu Gln Gly Leu Gly Pro Gly Pro Leu
                215                 220                 225

Cys Val His Cys Ser Ala Gly Cys Gly Arg Thr Gly Val Leu Cys
                230                 235                 240

Ala Val Asp Tyr Val Arg Gln Leu Leu Leu Thr Gln Thr Ile Pro
                245                 250                 255

Pro Asn Phe Ser Leu Phe Gln Val Val Leu Glu Met Arg Lys Gln
                260                 265                 270

Arg Pro Ala Ala Val Gln Thr Glu Glu Gln Tyr Arg Phe Leu Tyr
                275                 280                 285

His Thr Val Ala Gln Leu Phe Ser Arg Thr Leu Gln Asp Thr Ser
                290                 295                 300

Pro Gln Tyr Gln Asn Leu Lys Glu Asn Cys Ala Pro Ile Cys Lys
                305                 310                 315

Glu Ala Phe Ser Leu Arg Thr Ser Ser Ala Leu Pro Ala Thr Ser
                320                 325                 330

Arg Pro Pro Gly Gly Val Leu Arg Ser Ile Ser Val Pro Ala Pro
                335                 340                 345

Pro Thr Leu Pro Met Ala Asp Thr Tyr Ala Val Val Gln Lys Arg
                350                 355                 360

Gly Ala Ser Ala Gly Thr Gly Pro Gly Pro Arg Ala Pro Thr Ser
                365                 370                 375

Thr Asp Thr Pro Ile Tyr Ser Gln Val Ala Pro Arg Ala Gln Arg
                380                 385                 390

Pro Val Ala His Thr Glu Asp Ala Gln Gly Thr Thr Ala Leu Arg
                395                 400                 405

Arg Val Pro Ala Asp Gln Asn Ser Ser Gly Pro Asp Ala Tyr Glu
                410                 415                 420

Glu Val Thr Asp Gly Ala Gln Thr Gly Gly Leu Gly Phe Asn Leu
                425                 430                 435

Arg Ile Gly Arg Pro Lys Gly Pro Arg Asp Pro Pro Ala Glu Trp
                440                 445                 450

Thr Arg Val
        453
```

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 3:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 39 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

CACGGTCGAC GGTGAGGAGC TTCTTTGAGC AGCTGGAGG 39

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 4:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 42 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

GTTGCGGCCG CGATTGGAGC GCAGTTCTCC TTGAGGTTCT GG 42

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 5:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 36 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

CCTGGAGGGT CCTGAGAGTG ATGTCTGCAT TCAGTG 36

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 6:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

CCTCTTGGAG CAGGGAAAGG ATGACTCTTG TCTC 34

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 7:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 30 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

CAGCTGCTCC AAGAAGCTCC TCACCAAGTC 30

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 8:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 31 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

GGTAGAGGTG GGCAGGGTGA AGTGTTCTCG C 31

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 9:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 36 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

CACTGAATGC AGACATCACT CTCAGGACCC TCCAGG 36

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 10:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 10:

GAGACAAGAG TCATCCTTTC CCTGCTCCAA GAGG 34

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 11:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 25 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 11:

GAATGGTAAC CTGGAGGGTC CTGAG 25

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 12:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 18 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 12:

GAGAAGGTCG TGTTCGAG 18

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 13:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 18 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 13:

GTGTACTTCC TGTGCCTG 18

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 14:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 18 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 14:

ANTTNTGGNG ATGNTTGG 18

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 15:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 15 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 15:

GGACNNNNTC GGCCA 15

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 16:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 466 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 16:

GCGCGGGGCG GCCGGGAGGG GGCAGTCCTC GCCGGCGAGT TCAGCGACAT 50

CCAGGCCTGC TCGGCCGCCT GGAAGGCTGA CGGCGTGTGC TCCACCGTGG 100

CCGGCAGTCG GCCAGAGAAC GTGAGGAAGA ACCGCTACAA AGACGTGCTG 150

CCTTATGATC AGACGCGAGT AATCCTCTCC CTGCTCCAGG AAGAGGGACA 200

CAGCGACTAC ATTAATGGCA ACTTCATCCG GGGCGTGGAT GGAAGCCTGG 250

CCTACATTGC CACGCAAGGA CCCTTGCCTC ACACCCTGCT AGACTTCTGG 300

AGACTGGTCT GGGAGTTTGG GGTCAAGGTG ATCCTGATGG CCTGTCGAGA 350

GATAGAGAAT GGGCGGAAAA GGTGTGAGCG GTACTGGGCC CAGGAGCAGG 400

AGCCACTGCA GACTGGGCTT TTCTGCATCA CTCTGATAAA GGAGAAGTGG 450

CTGAATGAGG ACATCA 466

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 17:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 155 Aminosäuren

(B) Art: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 17

```
Ala Arg Gly Gly Arg Glu Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Phe Ser
 1               5                  10                  15

Asp Ile Gln Ala Cys Ser Ala Ala Trp Lys Ala Asp Gly Val Cys
            20                  25                  30

Ser Thr Val Ala Gly Ser Arg Pro Glu Asn Val Arg Lys Asn Arg
            35                  40                  45

Tyr Lys Asp Val Leu Pro Tyr Asp Gln Thr Arg Val Ile Leu Ser
            50                  55                  60

Leu Leu Gln Glu Glu Gly His Ser Asp Tyr Ile Asn Gly Asn Phe
            65                  70                  75

Ile Arg Gly Val Asp Gly Ser Leu Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly
            80                  85                  90

Pro Leu Pro His Thr Leu Leu Asp Phe Trp Arg Leu Val Trp Glu
            95                  100                 105

Phe Gly Val Lys Val Ile Leu Met Ala Cys Arg Glu Ile Glu Asn
           110                 115                 120

Gly Arg Lys Arg Cys Glu Arg Tyr Trp Ala Gln Glu Gln Glu Pro
           125                 130                 135

Leu Gln Thr Gly Leu Phe Cys Ile Thr Leu Ile Lys Glu Lys Trp
           140                 145                 150

Leu Asn Glu Asp Ile
           155
```

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 18

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 278 Aminosäuren

(B) Art: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 18

```
Phe Ala Ser Glu Phe Leu Lys Leu Lys Arg Gln Ser Thr Lys Tyr
 1               5                  10                  15

Lys Ala Asp Lys Ile Tyr Pro Thr Thr Val Ala Gln Arg Pro Lys
            20                  25                  30

Asn Ile Lys Lys Asn Arg Tyr Lys Asp Ile Leu Pro Tyr Asp His
            35                  40                  45

Ser Leu Val Glu Leu Ser Leu Leu Thr Ser Asp Glu Asp Ser Ser
            50                  55                  60

Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile Lys Gly Val Tyr Gly Pro Lys Ala
            65                  70                  75
```

```
Tyr Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ser Thr Thr Leu Leu Asp Phe
                80                  85                  90

Trp Arg Met Ile Trp Glu Tyr Arg Ile Leu Val Ile Val Met Ala
                95                 100                 105

Cys Met Glu Phe Glu Met Gly Lys Lys Lys Cys Glu Arg Tyr Trp
               110                 115                 120

Ala Glu Pro Gly Glu Thr Gln Leu Gln Phe Gly Pro Phe Ser Ile
               125                 130                 135

Ser Cys Glu Ala Glu Lys Lys Lys Ser Asp Tyr Lys Ile Arg Thr
               140                 145                 150

Leu Lys Ala Lys Phe Asn Asn Glu Thr Arg Ile Ile Tyr Gln Phe
               155                 160                 165

His Tyr Lys Asn Trp Pro Asp His Asp Val Pro Ser Ser Ile Asp
               170                 175                 180

Pro Ile Leu Gln Leu Ile Trp Asp Met Arg Cys Tyr Gln Glu Asp
               185                 190                 195

Asp Cys Val Pro Ile Cys Ile His Cys Ser Ala Gly Cys Gly Arg
               200                 205                 210

Thr Gly Val Ile Cys Ala Val Asp Tyr Thr Trp Met Leu Leu Lys
               215                 220                 225

Asp Gly Ile Ile Pro Lys Asn Phe Ser Val Phe Asn Leu Ile Gln
               230                 235                 240

Glu Met Arg Thr Gln Arg Pro Ser Leu Val Gln Thr Gln Glu Gln
               245                 250                 255

Tyr Glu Leu Val Tyr Ser Ala Val Leu Glu Leu Phe Lys Arg His
               260                 265                 270

Met Asp Val Ile Ser Asp Asn His
               275         278
```

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 19

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 272 Aminosäuren

(B) Art: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 19

```
Phe Ala Arg Asp Phe Met Arg Leu Arg Arg Leu Ser Thr Lys Tyr
 1               5                  10                  15

Arg Thr Glu Lys Ile Tyr Pro Thr Ala Thr Gly Glu Lys Glu Glu
                20                  25                  30

Asn Val Lys Lys Asn Arg Tyr Lys Asp Ile Leu Pro Phe Asp His
                35                  40                  45

Ser Arg Val Lys Leu Thr Leu Lys Thr Pro Ser Gln Asp Ser Asp
                50                  55                  60

Tyr Ile Asn Ala Asn Phe Ile Lys Gly Val Tyr Gly Pro Lys Ala
                65                  70                  75
```

```
Tyr Val Ala Thr Gln Gly Pro Leu Ala Asn Thr Val Ile Asp Phe
                80                  85                  90

Trp Arg Met Val Trp Glu Tyr Asn Val Val Ile Ile Val Met Ala
            95                  100                 105

Cys Arg Glu Phe Glu Met Gly Arg Lys Lys Cys Glu Arg Tyr Trp
        110                 115                 120

Pro Leu Tyr Gly Glu Asp Pro Ile Thr Phe Ala Pro Phe Lys Ile
    125                 130                 135

Ser Cys Glu Asp Glu Gln Ala Arg Thr Asp Tyr Phe Ile Arg Thr
140                 145                 150

Leu Leu Leu Glu Phe Gln Asn Glu Ser Arg Arg Leu Tyr Gln Phe
155                 160                 165

His Tyr Val Asn Trp Pro Asp His Asp Val Pro Ser Ser Phe Asp
170                 175                 180

Ser Ile Leu Asp Met Ile Ser Leu Met Arg Lys Tyr Gln Glu His
185                 190                 195

Glu Asp Val Pro Ile Cys Ile His Cys Ser Ala Gly Cys Gly Arg
200                 205                 210

Thr Gly Ala Ile Cys Ala Ile Asp Tyr Thr Trp Asn Leu Leu Lys
215                 220                 225

Ala Gly Lys Ile Pro Glu Glu Phe Asn Val Phe Asn Leu Ile Gln
230                 235                 240

Glu Met Arg Thr Gln Arg His Ser Ala Val Gln Thr Lys Glu Gln
245                 250                 255

Tyr Glu Leu Val His Arg Ala Ile Ala Gln Leu Phe Glu Lys Gln
260                 265                 270

Leu Gln
272
```

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 20:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strangform: Einzelstrang

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 20

ACTTGGTGAG GAGCTTCTTG GAGCAGCTGG AGG 33

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 21:
(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 24 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strangform: Einzelstrang
(D) Topologie: linear
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 21

GGAATGTAAC CTGGAGGGTC CTGA 24

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 22:
(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 19 Aminosäuren
(B) Art: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 22

Gly Phe Gly Asn Arg Phe Ser Lys Pro Lys Gly Pro Arg Asn Pro
1 5 10 15

Pro Ser Ala Trp
19

(2) Angaben zu SEQ ID NO: 23:
(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 21 Aminosäuren
(B) Art: Aminosäure
(D) Topologie: linear
(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 23

Ile Gly Phe Gly Asn Arg Cys Gly Lys Pro Lys Gly Pro Arg Asp
1 5 10 15

Pro Pro Ser Glu Trp Thr
20 21

Patentansprüche

1. Isolierte Nichtrezeptor-Proteintyrosinphosphatase von hämopoetischen Stammzellen (PTP HSC),
(1) die von DNA, die unter stringenten Bedingungen mit dem Komplement der Nucleinsäure von SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:16 hybridisiert, codiert wird;
(2) die in frühen hämopoetischen Stammzellen oder Vorläuferzellen exprimiert wird;
(3) deren Expression in differenzierten hämopoetischen Zellen herunterreguliert ist; und

(4) die eine N-terminale Tyrosinphosphatasedomäne, eine anschließende an Serin, Threonin und Prolin reiche Region und eine carboxyterminale Region von etwa 15 bis 25 Aminosäuren, die an basischen Aminosäureresten reich ist, umfasst.

2. PTP HSC nach Anspruch 1, die murin ist.

3. PTP HSC nach Anspruch 1, die human ist.

4. PTP HSC nach Anspruch 1, die die STAT-Aktivierung herunterreguliert.

5. Isolierte Nichtrezeptor-Proteintyrosinphosphatase von hämopoetischen Stammzellen (PTP HSC), die ausgewählt ist aus der Gruppe von:
(1) einem Protein, das die in SEQ ID NO:2 gezeigte Aminosäuresequenz umfasst;
(2) einem Protein, das die in SEQ ID NO:17 gezeigte Aminosäuresequenz umfasst; und
(3) einem weiteren Säugerhomologon von Protein (1) oder Protein (2), das in frühen hämopoetischen Stammzellen oder Vorläuferzellen exprimiert wird und dessen Expression in differenzierten hämopoetischen Zellen anderer Säugerarten herunterreguliert ist, das eine aktive N-terminale Tyrosinphosphatasedomäne, die einen Serinrest an einer der Aminosäureposition 37 in SEQ ID NO: 2 entsprechenden Position beibehält, eine an Serin, Threonin und Prolin reiche Region, die einen Cysteinrest eines aktiven Zentrums an einer der Aminosäureposition 229 in SEQ ID NO:2 entsprechenden Position beibehält, und eine carboxyterminale Region, die mindestens etwa 80 % Sequenzidentität mit der Aminosäuresequenz zwischen den Positionen 430 und 451 in SEQ ID NO:2 zeigt, umfasst.

6. Isoliertes Nucleinsäuremolekül mit Codierung für die PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5.

7. Vektor, der das Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 6 in funktionaler Verknüpfung mit Kontrollsequenzen, die von einer mit dem Vektor transformierten Wirtszelle erkannt werden, umfasst.

8. Wirtszelle in einer Zellkultur, die mit dem Vektor nach Anspruch 7 transformiert ist.

9. Antikörper, der spezifisch an die PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 binden kann.

10. Antikörper nach Anspruch 9, der ein Antagonist von PTP HSC ist.

11. Hybridomzelllinie, die einen Antikörper nach Anspruch 9 oder Anspruch 10 produziert.

12. Test zur Identifizierung eines Antagonisten oder Agonisten einer PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5, der das Inkontaktbringen der Phosphatasedomäne der PTP HSC mit einem Antagonist- oder Agonistkandidaten und das Überwachen der Fähigkeit der Phosphatasedomäne zur Dephosphorylierung von Tyrosinresten umfasst.

13. Verfahren zur Differenzierung undifferenzierter bösartiger hämopoetischer Zellen in Zellkultur, das das Inkontaktbringen der Zellen mit einem Antagonistantikörper einer PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 umfasst.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Zellen Leukämiezellen sind.

15. Verfahren zur Induktion der Differenzierung von nichtembryonalen Stammzellen in Zellkultur, das das Inkontaktbringen der Zellen mit einem Antagonistantikörper einer PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 umfasst.

16. Verfahren zur Expansion undifferenzierter nichtembryonaler Stammzellen in Zellkultur, das (a) die Zugabe einer PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 zu der Zellkultur und (b) das Kultivieren der undifferenzierten Stammzellen umfasst.

17. Verwendung eines Agonistantikörpers, der spezifisch an eine PTP HSC gemäß der Definition in Anspruch 1 oder Anspruch 5 bindet, und eines hämopoetischen Wachstumsfaktors bei der Herstellung eines Medikaments zur Expansion undifferenzierter Stammzellen bei einem Patienten.

18. Verwendung eines Antagonistantikörpers einer PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 bei der

Herstellung eines Medikaments zur Differenzierung undifferenzierter bösartiger hämopoetischer Zellen.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Zellen Leukämiezellen sind.

20. Verwendung eines Antagonistantikörpers einer PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 bei der Herstellung eines Medikaments zur Induktion der Differenzierung von Stammzellen.

21. Antagonistantikörper einer PTP HSC nach Anspruch 1 oder Anspruch 5 zur Verwendung in der Medizin.

22. Agonistantikörper, der spezifisch an PTP HSC gemäß der Definition in Anspruch 1 oder Anspruch 5 bindet, zur Verwendung in der Medizin.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

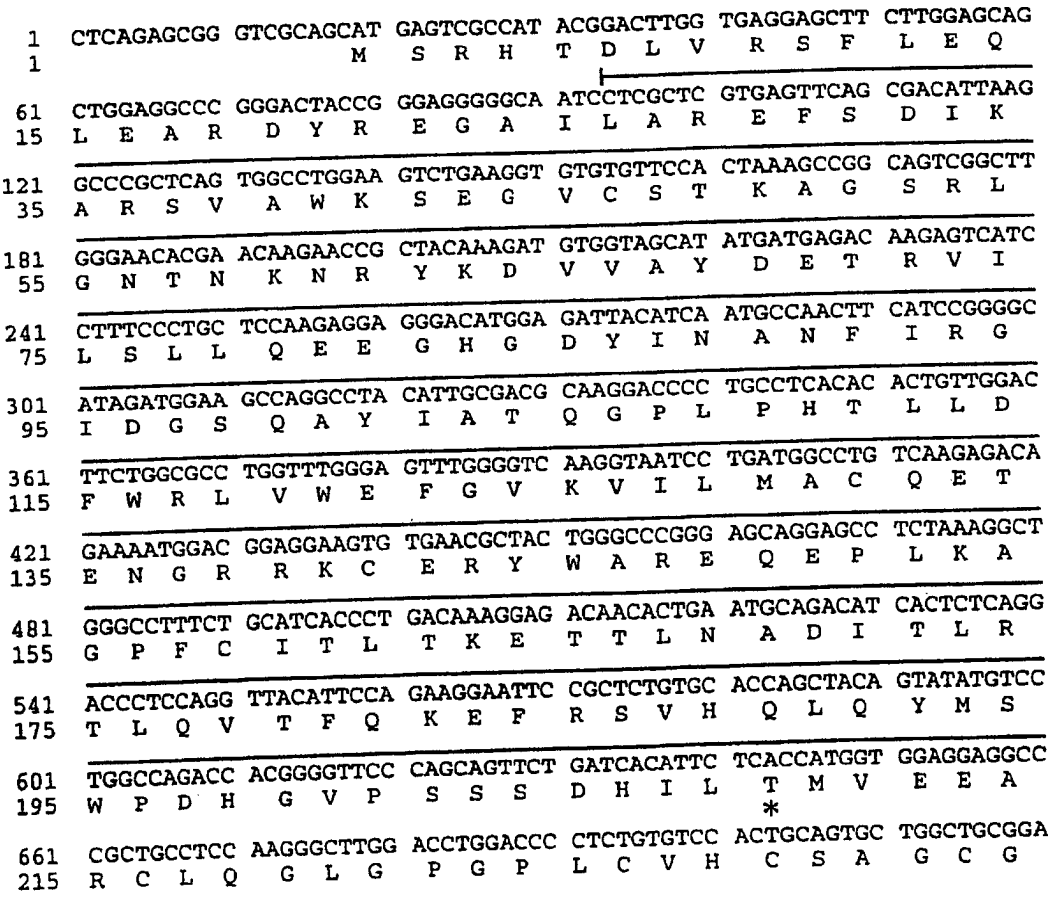


FIG. 1A

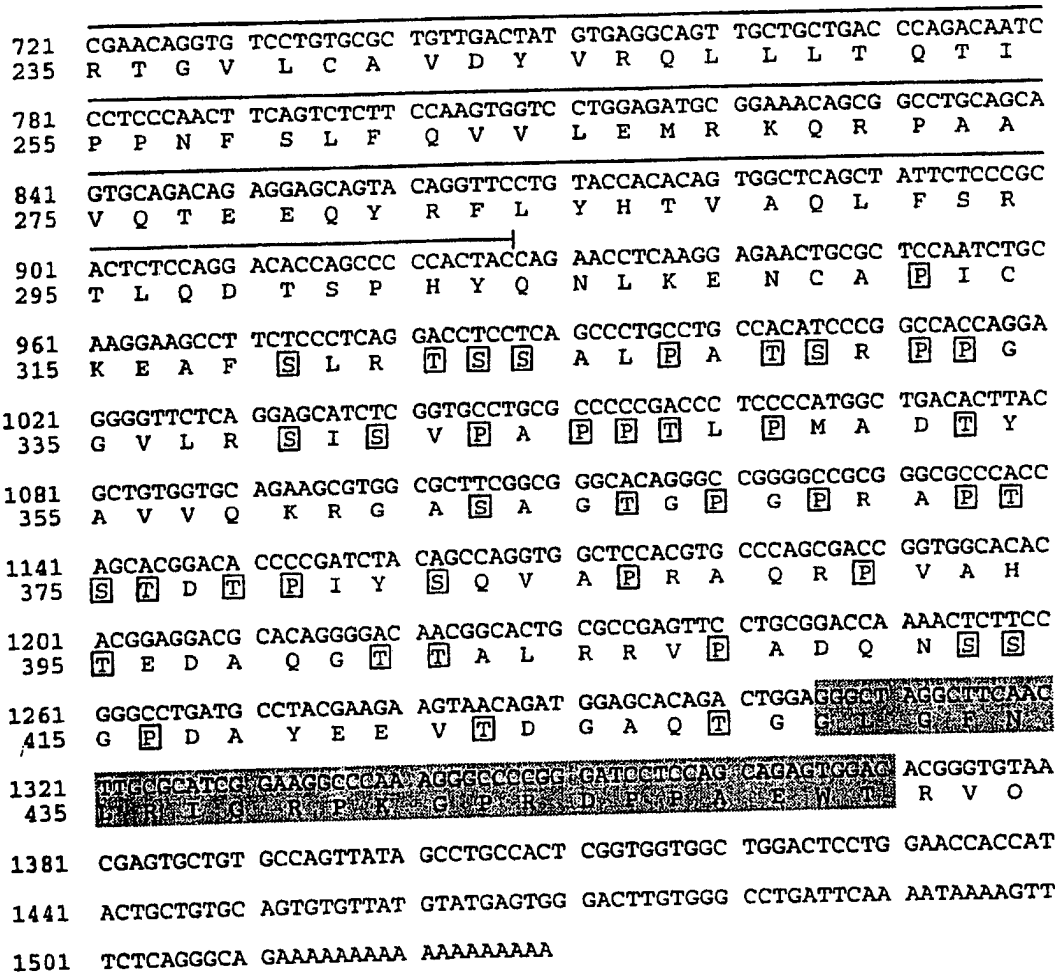

721 CGAACAGGTG TCCTGTGCGC TGTTGACTAT GTGAGGCAGT TGCTGCTGAC CCAGACAATC
235 R T G V L C A V D Y V R Q L L L T Q T I
781 CCTCCCAACT TCAGTCTCTT CCAAGTGGTC CTGGAGATGC GGAAACAGCG GCCTGCAGCA
255 P P N F S L F Q V V L E M R K Q R P A A
841 GTGCAGACAG AGGAGCAGTA CAGGTTCCTG TACCACACAG TGGCTCAGCT ATTCTCCCGC
275 V Q T E E Q Y R F L Y H T V A Q L F S R
901 ACTCTCCAGG ACACCAGCCC CCACTACCAG AACCTCAAGG AGAACTGCGC TCCAATCTGC
295 T L Q D T S P H Y Q N L K E N C A P I C
961 AAGGAAGCCT TCTCCCTCAG GACCTCCTCA GCCCTGCCTG CCACATCCCG GCCACCAGGA
315 K E A F S L R T S S A L P A T S R P P G
1021 GGGGTTCTCA GGAGCATCTC GGTGCCTGCG CCCCCGACCC TCCCCATGGC TGACACTTAC
335 G V L R S I S V P A P P T L P M A D T Y
1081 GCTGTGGTGC AGAAGCGTGG CGCTTCGGCG GGCACAGGGC CGGGGCCGCG GGCGCCCACC
355 A V V Q K R G A S A G T G P G P R A P T
1141 AGCACGGACA CCCCGATCTA CAGCCAGGTG GCTCCACGTG CCCAGCGACC GGTGGCACAC
375 S T D T P I Y S Q V A P R A Q R P V A H
1201 ACGGAGGACG CACAGGGGAC AACGGCACTG CGCCGAGTTC CTGCGGACCA AAACTCTTCC
395 T E D A Q G T T A L R R V P A D Q N S S
1261 GGGCCTGATG CCTACGAAGA AGTAACAGAT GGAGCACAGA CTGGAGGGCT AGGCTTCAAC
415 G P D A Y E E V T D G A Q T G G L G F N
1321 ATTGCCATCG GAAGGCCCAA AGGGCCCCGG GATCCTCCAG CAGAGTGGAC ACGGGTGTAA
435 I A I G R P K G P R D P P A E W T R V O
1381 CGAGTGCTGT GCCAGTTATA GCCTGCCACT CGGTGGTGGC TGGACTCCTG GAACCACCAT
1441 ACTGCTGTGC AGTGTGTTAT GTATGAGTGG GACTTGTGGG CCTGATTCAA AATAAAAGTT
1501 TCTCAGGGCA GAAAAAAAAA AAAAAAAAA

FIG. IB

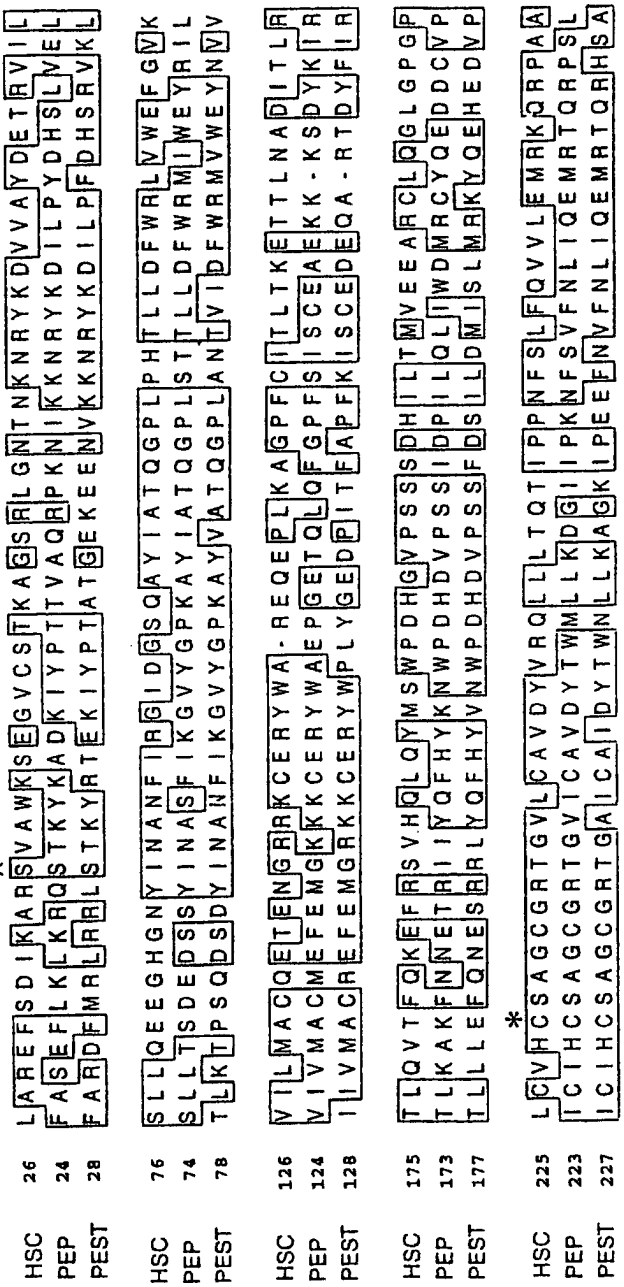


FIG. 2A

FIG. 2B

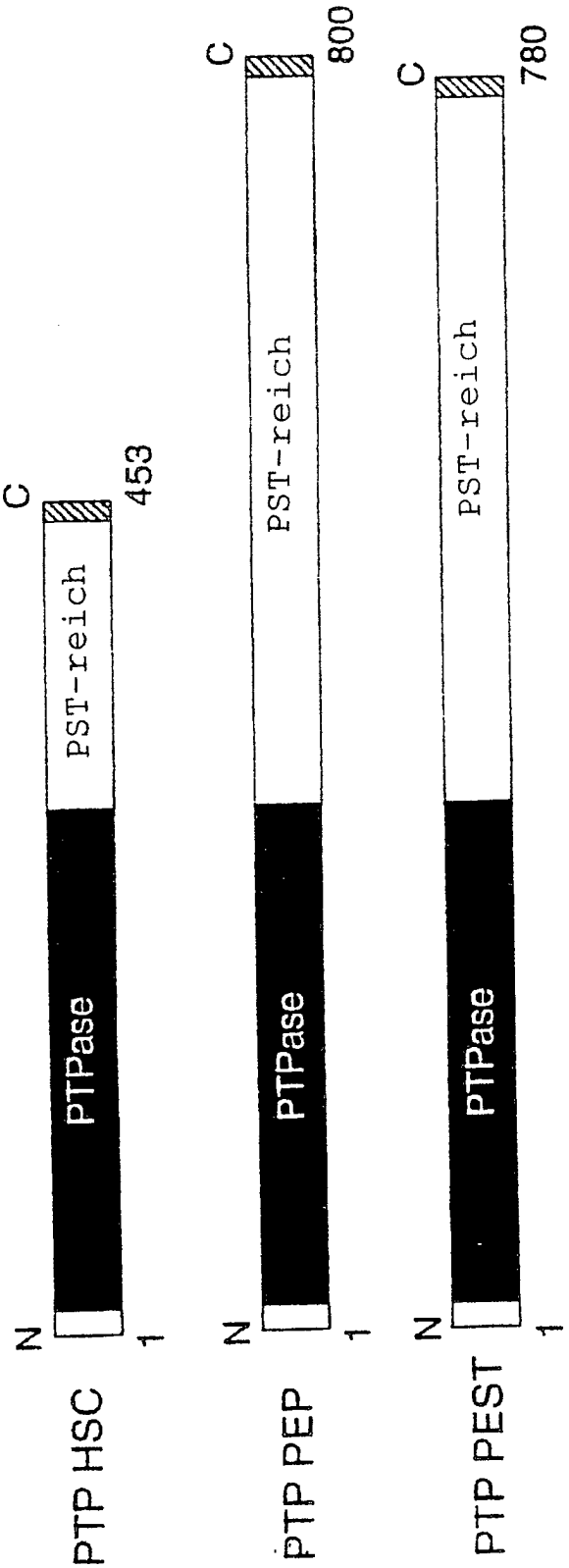

C
453
PST-reich
PTPase
N
1
PTP HSC
C
800
PST-reich
PTPase
N
1
PTP PEP
C
780
PST-reich
PTPase
N
1
PTP PEST

FIG. 3


N
C
PTPase
PST-reich
1
453

FIG. 4

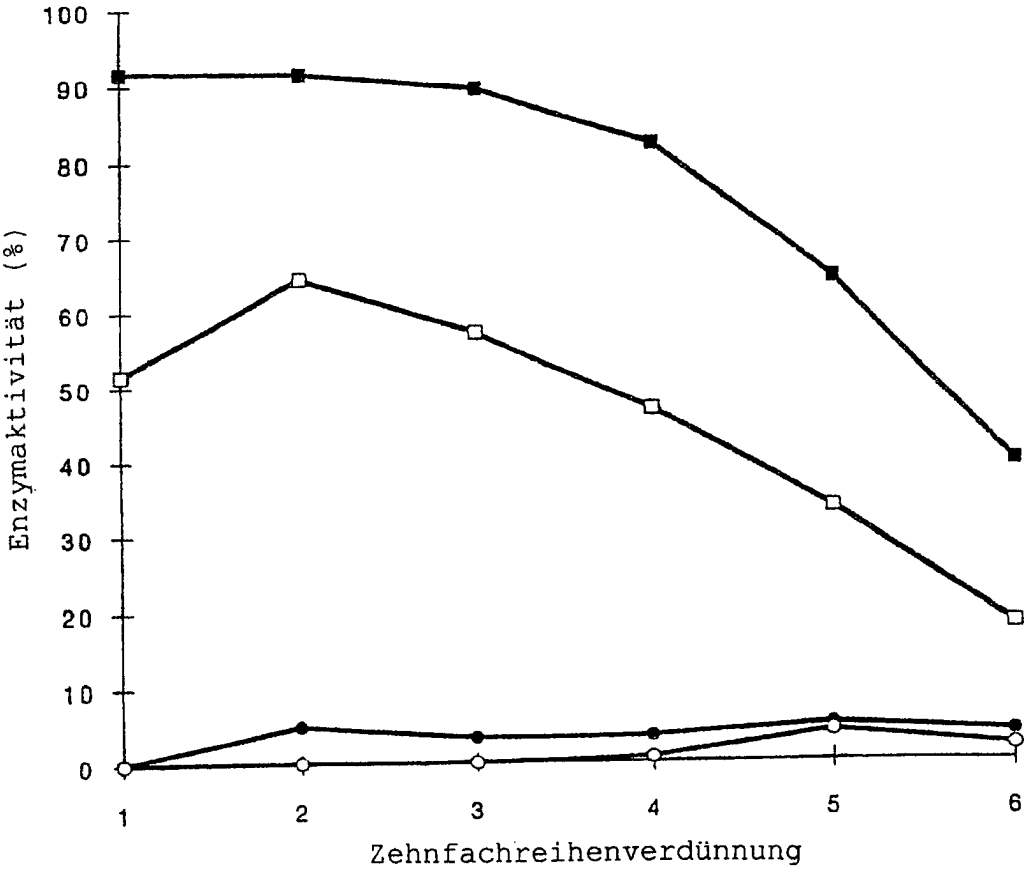

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Enzymaktivität (%)
1
2
3
4
5
6
Zehnfachreihenverdünnung

FIG. 5

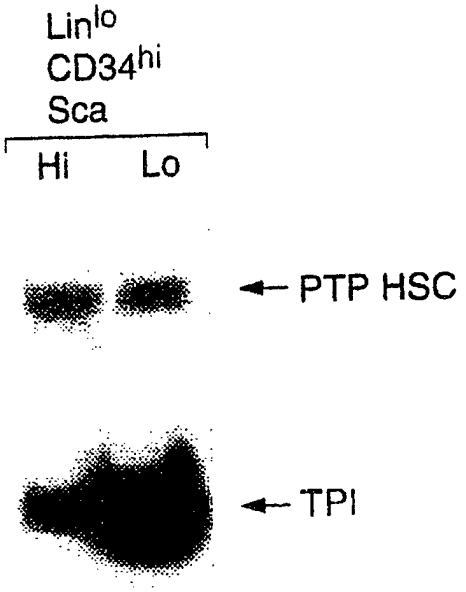

Lin^{lo}
CD34^{hi}
Sca
Hi
Lo
PTP HSC
TPI

FIG. 6A

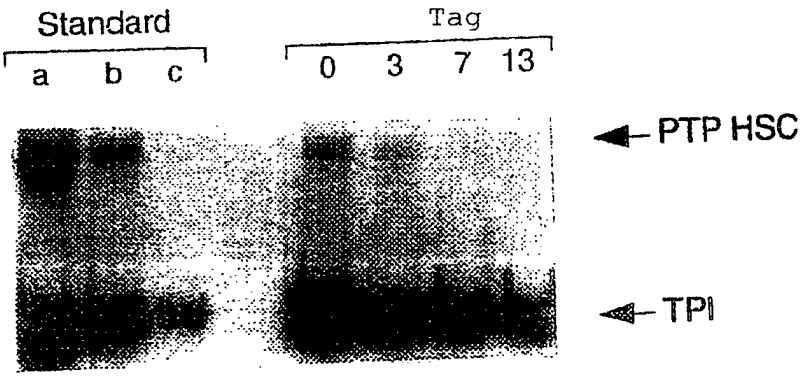

Standard
a
b
c
Tag
0
3
7
13
PTP HSC
TPI

FIG. 6B

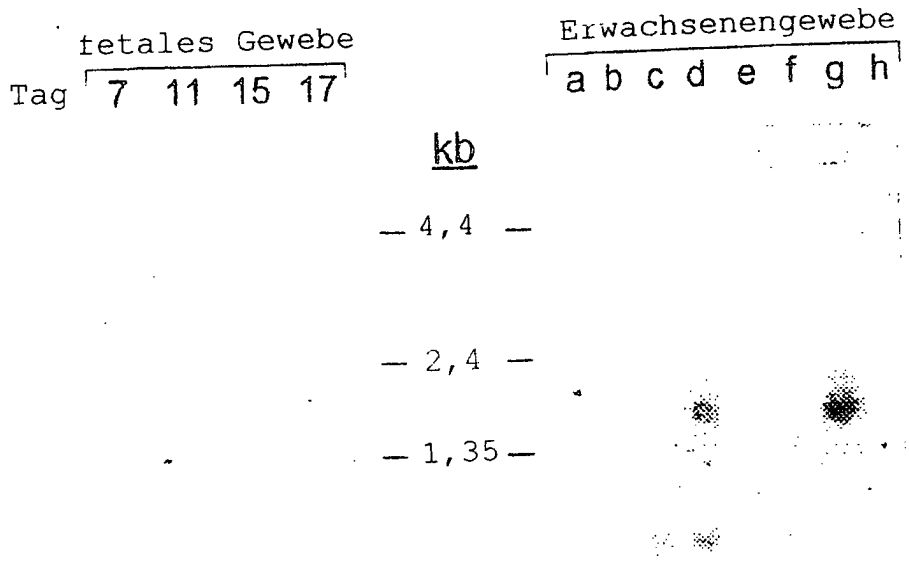

fetales Gewebe
Tag 7 11 15 17
Erwachsenengewebe
a b c d e f g h
kb
4,4
2,4
1,35

FIG. 7A

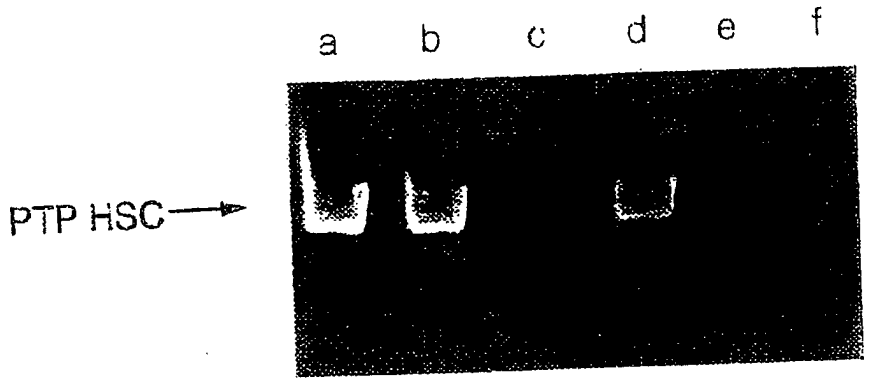

a b c d e f
PTP HSC

FIG. 7C

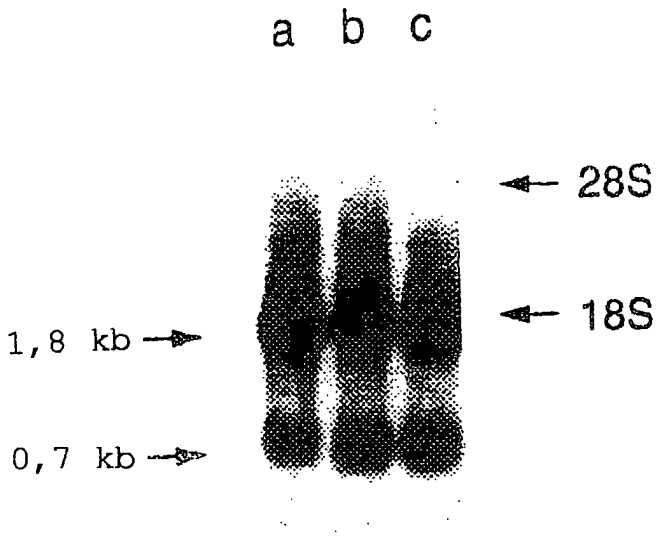
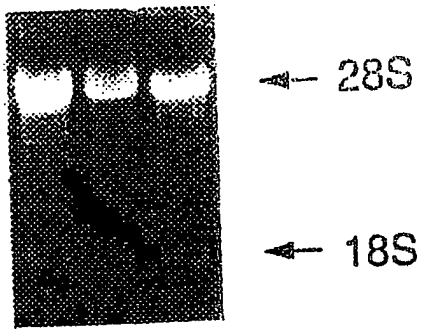


FIG. 7B-



GCGCGGGGCG GCCGGGAGGG GGCAGTCCTC GCCGGCGAGT TCAGCGACAT 50

CCAGGCCTGC TCGGCCGCCT GGAAGGCTGA CGGCGTGTGC TCCACCGTGG 100

CCGGCAGTCG GCCAGAGAAC GTGAGGAAGA ACCGCTACAA AGACGTGCTG 150

CCTTATGATC AGACGCGAGT AATCCTCTCC CTGCTCCAGG AAGAGGGACA 200

CAGCGACTAC ATTAATGGCA ACTTCATCCG GGGCGTGGAT GGAAGCCTGG 250

CCTACATTGC CACGCAAGGA CCCTTGCCTC ACACCCTGCT AGACTTCTGG 300

AGACTGGTCT GGGAGTTTGG GGTCAAGGTG ATCCTGATGG CCTGTCGAGA 350

GATAGAGAAT GGGCGGAAAA GGTGTGAGCG GTACTGGGCC CAGGAGCAGG 400

AGCCACTGCA GACTGGGCTT TTCTGCATCA CTCTGATAAA GGAGAAGTGG 450

CTGAATGAGG ACATCA 466

FIG. 8A

Ala Arg Gly Gly Arg Glu Gly Ala Val Leu Ala Gly Glu Phe Ser
1 5 10 15

Asp Ile Gln Ala Cys Ser Ala Ala Trp Lys Ala Asp Gly Val Cys
20 25 30

Ser Thr Val Ala Gly Ser Arg Pro Glu Asn Val Arg Lys Asn Arg
35 40 45

Tyr Lys Asp Val Leu Pro Tyr Asp Gln Thr Arg Val Ile Leu Ser
50 55 60

Leu Leu Gln Glu Glu Gly His Ser Asp Tyr Ile Asn Gly Asn Phe
65 70 75

Ile Arg Gly Val Asp Gly Ser Leu Ala Tyr Ile Ala Thr Gln Gly
80 85 90

Pro Leu Pro His Thr Leu Leu Asp Phe Trp Arg Leu Val Trp Glu
95 100 105

Phe Gly Val Lys Val Ile Leu Met Ala Cys Arg Glu Ile Glu Asn
110 115 120

Gly Arg Lys Arg Cys Glu Arg Tyr Trp Ala Gln Glu Gln Glu Pro
125 130 135

Leu Gln Thr Gly Leu Phe Cys Ile Thr Leu Ile Lys Glu Lys Trp
140 145 150

Leu Asn Glu Asp Ile
155

FIG. 8B