



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2 PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION
PCT

FASE NACIONAL

21 EXPEDIENTE N°

02-89194

54 TÍTULO

ISOFORMAS DE ESFINGOSINA CINASA TIPO 2 DE MAMIFERO, CLONACION,

EXPRESION Y METODOS DE USO DE LAS MISMAS

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL COZH 21:74

71 SOLICITANTES

SANKYO COMPANY, LIMITED y GEORGETOWN UNIVERSITY

DOMICILIOs

Tokyo, Japón y Washington, Estados Unidos de América, respect

74 APODERADO

EMILIO FERRERO

Código No 1092

22 BOGOTÁ, D C.

03/10/2002

202040



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 089194 00

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 02089194 00000000

Folios: 231 dón

Fecha (M3): 2002-10-05/17:04:58

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SANKYO COMPANY, LIMITED y**
GEORGETOWN UNIVERSITY
sociedades constituidas y existentes bajo
las leyes del Japón y Estados Unidos de
América, respectivamente.

Direcciones: 5-1-Nihonbashi Honcho 3-
chome Chuo-ku, Tokyo, Japón y
37th & "O" Streets, N.W. Washington,
D.C. 20057, Estados Unidos de América,
respectivamente.

Domicilios: Tokyo, Japón y Washington,
Estados Unidos de América,
respectivamente.

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número:

3

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: **EMILIO FERRERO**Dirección: Carrera 4^a. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 217 92 11

E-mail: clientes@camyo.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número: 438.019 T.P. 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1- Sarah SPIEGEL
8343 Linway Terrace,
McLean, Virginia 22101,
Estados Unidos de América.

2- Takafumi KOHAMA
c/o SANKYO COMPANY, LIMITED
2-58, Hiromachi 1-chome
Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710
Japón.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US01/09884 ✓Publicación Internacional No. WO 01/74837 A1 ✓Fecha: 26 de marzo de 2001 ✓Fecha: 11 de octubre de 2001 ✓

6

Título (54) ISOFORMAS DE ESFINGOSINA CINASA TIPO 2 DE MAMIFERO. CLONACION,
EXPRESION Y METODOS DE USO DE LA MISMAS

7

Clasificación Internacional (51) C07H 021/004

8

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US.

(32) Fecha

3 de abril 2000

(31) Número de Solicitud

60/194.318

9

Comprobante de pago No.: 02-63.528 Fecha: 23 de septiembre de 2002

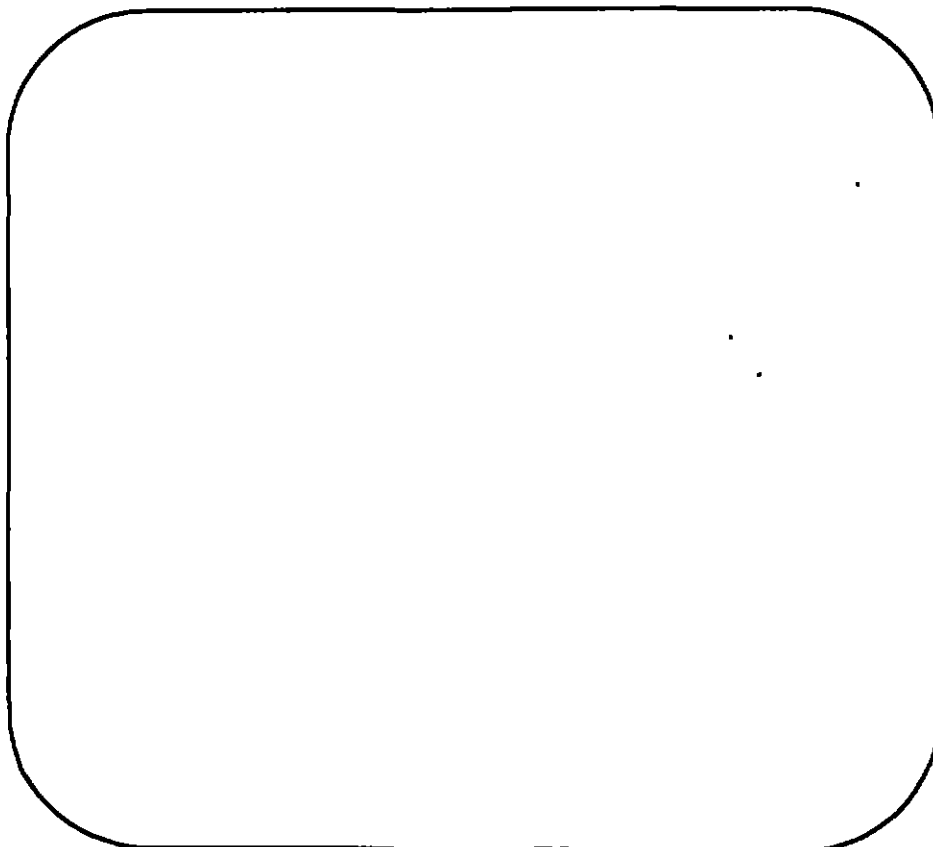
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por 378.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. (SANKYO COMPANY, LIMITED).
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA:

Emilio Ferrero

C.C. 438.018 de Usaquén T.P. 31.929

de SP

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CALLE 4ª N° 72-85

BOGOTÁ, S. COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (a)
SANKYO COMPANY, LIMITED

of/domiciliado (a) en 5-1. 3-chome.

Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan, hereby ratify the appins.

01084567; 01084568; 01084570; 01084571; 01084572; 01084574. filed by Emilio Ferrero on Oct. 3/01

por el presente nombramos a GERMAN CAVALIER, tpa. 882; GONZALO PERDOMO, tpa. 881; EMILIO FERRERO, tpa. 81929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23553; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-85, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como tales (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

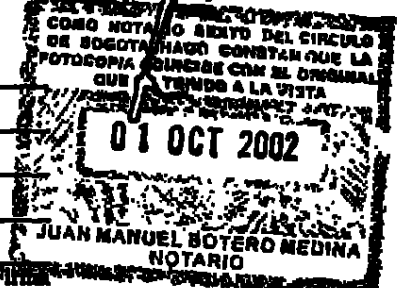
Given and signed this / Dado y firmado hoy

4th day of October, 2001

in/en Tokyo, Japan

X: 
Signature

Tatsuo Takato
Representative Director and President

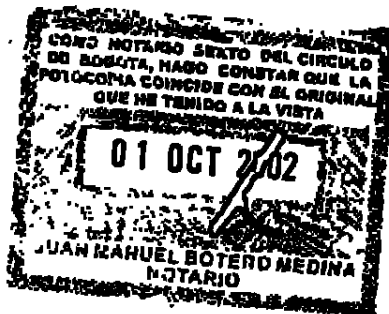


LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un certificado consular sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia's Consul must issue a consular certificate, on (1) the legal existence of the company which grants the Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).



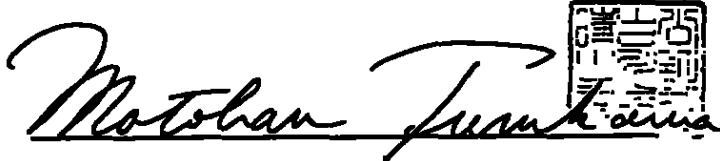
NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

Registration No. 1021 of 2001

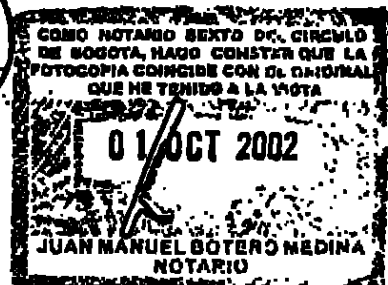
NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that Tetsuo TAKATO who is Representative Director and President of SANKYO COMPANY, LIMITED, a corporation duly organized and existing under the Laws of Japan, located at 5-1, 3-chome, Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japan and who is authorized to sign the attached document, has acknowledged himself that signature on the foregoing document is his own.

Dated on this 4th day of October, 2001.




Notary: MOTOHARU FURUKAWA



100

COMO NOTARIO PRESENTE EN EL CIRCULO
DE BOGOTA, HAY CONSTANCIA QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
01 OCT 2002
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

平成 13 年 登 簿 第 1021 号
認 証

嘱 託 人 三共株式会社 (本店 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号)

代表取締役 高藤鉄雄は、日本国法に基づいて設立された同会社を代表し

その権限に基づき添付証書に署名した旨、本公証人に対し自認した。

よって、これを認証する。

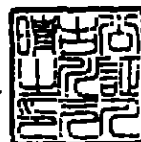
平成 13 年 10 月 4 日、本公証人役場において

東京都千代田区麹町 5 丁目 2 番地 1

東京法務局所属

公証人

古川元晴



証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成 13 年 10 月 4 日

東京法務局長

寶金敏明

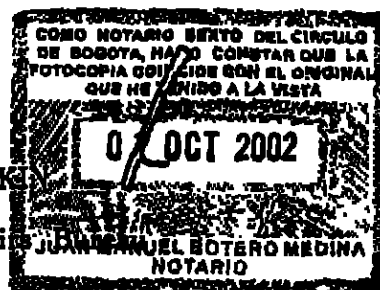
CERTIFICATE

This is to certify that the signature affixed above has been provided by Notary, duly authorized by the Tokyo Legal Affairs Bureau and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date 4th October, 2001

Toshiaki HOUKE

Director of the Tokyo Legal Affairs



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by Toshiaki HOUKIN

3. acting in the capacity of Director of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at Tokyo

6. 4th October, 2001

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 01 - Nº 021563

9. Seal/stamp:

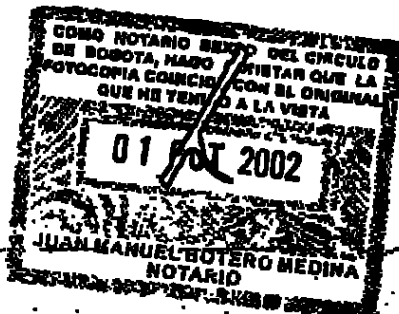
10. Signature:



T. Mochizuki

Takeshi MOCHIZUKU

For the Minister for Foreign Affairs





THE TOKYO CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY

3-2-2 MARUNOUCHI, CHIYODA-KU, TOKYO 100-0005, JAPAN PHONE: 81-3-3283-7610 FAX: 81-3-3201-6285

October 4, 2001

To whom it may concern

PHOTOCOPIA

Certificate

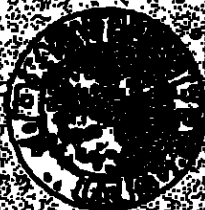
We hereby certify that the undermentioned company was established in accordance with Japanese Commercial Law.

Name of the company : SANKYO COMPANY, LIMITED

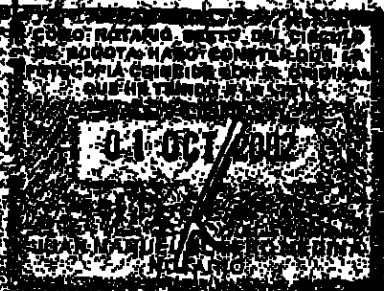
Registered address : 5-1, Nihonbashi-honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokyo

Date of establishment : March 1, 1913

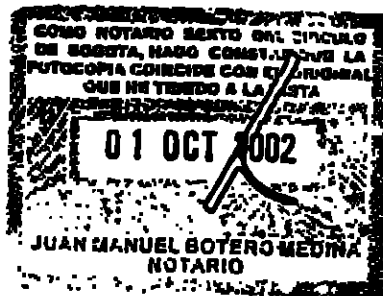
The Tokyo Chamber of Commerce and Industry



Hiroyuki Amaya
Assistant Manager



mm



8

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 12.10/01 realizada por Dieg Vargas,
Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de
Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores
de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un
documento de escrito en inglés y español por medio del cual
SANKYO COMPANY, LIMITED domiciliado en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokio, Japón por el presente ratifica
las solicitudes de registro de marca Nos. 01084567, 10184568,
01084570, 01084571, 01084572, 01084574, presentadas por el Dr.
Emilio Ferrero el 03 de octubre de 2001.

Y adicionalmente otorga derechos de Representación y Poder a los
Doctores GERMÁN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831;
EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555.

Dado y firmado hoy _____

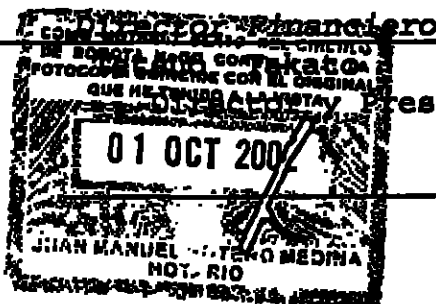
4 de octubre de 2001

En Tokio, Japón

Firma

(Anexo)

Registro No. 1021 de 2001



Firma

Presidente Representativo

CERTIFICADO NOTARIAL

El presente es para certificar que Tetsuo TAKATO, quien
es Director y Presidente Representativo de SANKYO COMPANY,
LIMITED, una corporación debidamente constituida y existente de

9

acuerdo a las Leyes de Japón, ubicada en el 5-1, 3-chome,
Nihonbashi-honch , Chu -ku, Tokio, Japón y quien está autorizado
a firmar el adjunto documento, ha reconocido él mismo que la
firma en el anterior documento es la suya.

Fechado hoy 4 de octubre de 2001.

Firma ilegible

Notario: MOTOHARU FURUKAWA

Oficina de Asuntos Legales de Tokio
OFICINA NOTARIAL
5-2-1, Kojimachi, Chiyoda-ku,
Tokio, Japón

Sellos rojos cuadrados en la parte superior así como al lado de
la firma anterior.

LA CÁMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA DE TOKIO

3-2-2 MARUNOUCHI, CHIYODA-KU, TOKIO 100-0005, JAPÓN TEL:81-3-3283-7610 FAX:81-3-3201-6265

Octubre 4 de 2001

A quien pueda interesar:



Certificado

Por el presente certificamos que la compañía mencionada a
continuación fue constituida de acuerdo a la Ley Comercial
Japonesa.

N mbre de la compañía: SANKYO COMPANY, LIMITED

D

Domicili : 5-1, Nih nbashi-honcho 3-ch me, Chu -ku, Tokio

Fecha de Constitución: 1 de Marzo de 1913

La Cámara de Comercio e Industria de Tokio

Firma Ilegible

Hiroyuki Amaya

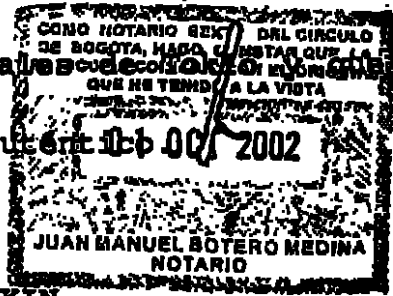
Subdirector

Sello: LA CÁMARA DE COMERCIO DE TOKIO

B064302

Aparece un anexo en japonés con el número 1021 en la parte superior y con varios sellos cuadrados en tinta roja en todo el documento. En la parte inferior aparece texto en inglés:

CERTIFICADO

El presente es para certificar que la firma colocada anteriormente ha sido otorgada por un Notario, debidamente autorizado por la Oficina de Asuntos Legales.  el Sello Oficial que aparece en el mismo es auténtico. 00/2002

Fecha: 4 de octubre de 2001

Toshiaki HOUKIN

Director de la Oficina de Asuntos Legales

APOSTILLA

(Conventi n de La Haye du 5 octubre 1961)

1. País: JAPÓN

- Este documento público
2. ha sido firmado por Toshiaki HOUKIN
 3. actuando en capacidad de Director de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio
 4. lleva el sello/estampilla de

CERTIFICADO

5. en Tokio
6. El 4 de octubre de 2001
7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores
8. 01- No. 021563
9. Sello/estampilla
10. Firma:



Firma

Takeshi MOCHIZUKI

Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

01-10-2001 14:10:00
 01-10-2001 14:10:00
 01-10-2001 14:10:00
 01-10-2001 14:10:00

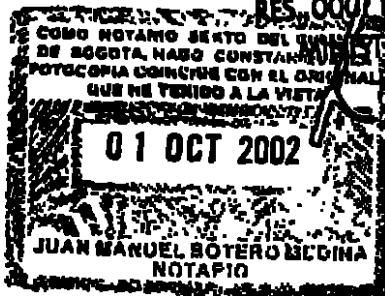
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

/COLO 01579-701-005-3 /DVZ/ID-2743/WPCL002G/

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL

RES. 0007 DE ENERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA



2000 OCT 12 PM 13

**JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTIAFE DE BOGOTA D.C.**

**MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES**

179830

Diego López
YÁ FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESAPAR-
TIS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIORES FIR-
MA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES/SON AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA,

12 OCT. 2001

[Stamp: NOTARIA...]

**PABLO MENDEZ
BARAJAS**

COMO NOTARIO SEXATO DEL ARTICULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

01 OCT 2002

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

CAVELIER

AB GADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señora Jefe de la

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Poderdante: SANKYO COMPANY, LIMITED

Poder conferido el: 04-10-2001

Yo, GERMÁN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señora Jefe,

GERMÁN CAVELIER

T.P.A. No. 832

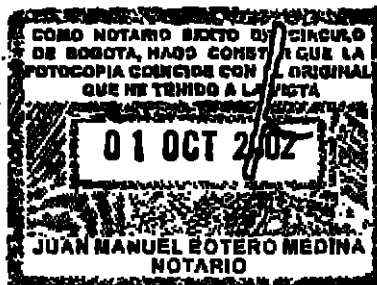
C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:

EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



2e-780-2

OFICINA NOTARIAL DE BOGOTÁ

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACIÓN PERSONAL

Bogotá, D.C. 05 JUN 2002

Acto no. JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

NOTARIO CERTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ

Comprobación:

[Handwritten signature]

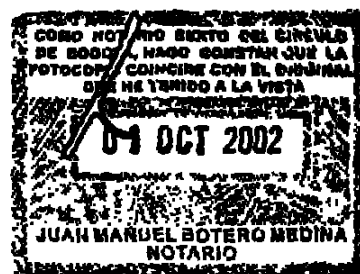
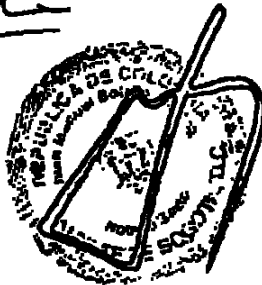
2877924-428019

882-832-31929

En el presente documento se declara que el contenido del mismo es cierto, en conformidad con la ley de la República de Colombia.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 October 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/74837 A1

(51) International Patent Classification: C07H 21/04,
C12N 9/12, I5/63, 5/00, 5/04, 5/06, 1/20, 1/16, C12P
21/06, C12Q 1/48, G01N 33/53, A61K 38/45, 39/395,
31/70

(21) International Application Number: PCT/US01/09664

(22) International Filing Date: 26 March 2001 (26.03.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/194,318 3 April 2000 (03.04.2000) US
09/617,676 26 March 2001 (26.03.2001) US

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AT
(utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, ~~CO~~, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE
(utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EE, EE
(utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GB, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,
VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicants: SANKYO COMPANY, LIMITED [JP/JP];
3-1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103
(JP). GEORGETOWN UNIVERSITY [US/US]; 37th &
"O" Streets, N.W., Washington, DC 20057 (US).

(71) Applicants and
(72) Inventors: SPIEGEL, Sarah [US/US]; 6343 Linway
Terrace, McLean, VA 22101 (US). KOHAMA, Taka-
fumi [JP/JP]; 1-4-5-614, Motomachi, Kiyose-shi, Tokyo
204-0021 (JP).

(74) Agents: BARTH, Richard, S. et al.; Frislauf, Holtz,
Goodman, Langer & Chick, P.C., 767 Third Avenue, New
York, NY 10017-2023 (US).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MAMMALIAN SPHINGOSINE KINASE TYPE 2 ISOFORMS, CLONING, EXPRESSION AND METHODS OF USE
THEREOF

(57) Abstract: Nucleic acids encoding mouse and human sphingosine kinase type 2 isoforms, methods for detecting agents or drugs
which inhibit or promote sphingosine activity and therapeutic agents containing peptides or antibodies to peptides encoded by such
nucleic acids.

WO 01/74837 A1

14

**MAMMALIAN SPHINGOSINE KINASE TYPE 2 ISOFORMS,
CLONING, EXPRESSION AND METHODS OF USE THEREOF**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

The present application claims the benefit of Provisional Application Serial No. 60/194,318, filed April 3, 2000, wherein priority under 35 USC 119(a) is claimed.

GOVERNMENT RIGHTS

This invention was made with United States government support under Grant GM 43880 from the National Institutes of Health and a Postdoctoral Fellowship BC961968 from the United States Army Medical Research and Materiel Command, Prostate Cancer Research Program (VEN). The United States government has certain rights in this invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

The present invention concerns mammalian (such as mouse and human) sphingosine kinase type 2 isoforms, the molecular cloning of such isoforms and methods of use of such isoforms. Sphingosine kinase type 2 has distinct characteristics when compared to sphingosine kinase type 1.

Background Information

Sphingosine-1-phosphate (SPP) is a bioactive sphingolipid metabolite which regulates diverse biological processes acting both inside cells as a second messenger to regulate proliferation and survival and outside cells as a ligand for G-protein coupled receptors of the EDG-1 subfamily (Spiegel, S., *J. Leukoc. Biol.*, 65, (1999), 341-344; Goetzl, E.J., *An. S. FASEB J.*, 12, (1998), 1589-1598). Thus, SPP plays important roles as a second messenger to regulate cell growth and survival (Olivera, A., Spiegel, S., *Nature*, 365, (1993), 557-560; Cu villier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., and Spiegel, S., *Nature*, 381, (1996), 800-803).

Many external stimuli, particularly growth and survival factors, activate sphingosine kinase ("SPHK"), the enzyme that forms SPP from sphingosine. This rapidly growing list includes platelet-derived growth factor ("PDGF") (Olivera, A., Spiegel, S., Natura, **365**, (1993), 557-560; Pyne, S., Chapman, J. Steele, L., and Pyne, N.J., Eur. J. Biochem., **237**, (1996), 819-826; Coroneos, E., Martinez, M., McKenna, S. and Kester, M., J. Biol. Chem., **270**, (1995), 23305-23309), nerve growth factor ("NGF") (Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and Spiegel, S., J. Neurosci., **17**, (1997), 6952-6960; Rius, R.A., Edsall, L.C., and Spiegel, S., FEBS Lett., **417**, (1997), 173-176), vitamin D3 (Kleuser, B., Cuvillier, O., and Spiegel, S., Cancer Res., **58**, (1998) 1817-1824), muscarinic acetylcholine agonists (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann, E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H., and van Koppen, C.J., EMBO J., **17**, (1998), 2830-2837), TNF- α (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J., and Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, (1998), 14196-14201), and the cross-linking of the immunoglobulin receptors Fc ϵ R1 (Choi, O. H., Kim, J.-H., and Kinet, J.-P., Natura, **380**, (1996), 634-636) and Fc γ R1 (Melendez, A., Floto, R. A., Gillooly, D. J., Harnett, M. M., and Allen, J.M., J. Biol. Chem., **273** (1998), 9393-9402).

Intracellular SPP, in turn, mobilizes calcium from internal stores independently of InsP3 (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann, E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H., and van Koppen, C.J., EMBO J., **17**, (1998), 2830-2837; Mattie, M., Brooker, G., and Spiegel, S., Biol. Chem., **269**, (1994), 3181-3188), as well as eliciting diverse signaling pathways leading to proliferation (Rani, C.S., Berger, A., Wu, J., Sturgill, T. W., Beitner-Johnson, D., LeRoith, D., Varticovski, L., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., **272**, (1997), 10777-10783; Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier,

16

O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., and Spiegel, S., J. Cell Biol., **142**, (1998), 229-240) and suppression of apoptosis (Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., and Spiegel, S., Nature, **381**, (1996), 800-803; Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and Spiegel, S., J. Neurosci., **17**, (1997), 6952-6960; Van Brocklyn, J.R., Lee, M. J., Manzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., and Spiegel S., J. Cell Biol., **142**, (1998), 229-240).

Moreover, competitive inhibitors of sphingosine kinase block formation of SPP and selectively inhibit calcium mobilization, cellular proliferation and survival induced by these various stimuli (Spiegel, S., J. Leukoc. Biol., **65**, (1999), 341-344). Thus, it has been suggested that the dynamic balance between levels of the sphingolipid metabolites, ceramide and SPP, and the consequent regulation of opposing signaling pathways, is an important factor that determines the fate of cells (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 2910-2916). For example, stress stimuli increase ceramide levels leading to apoptosis, whereas survival factors stimulate SPHK leading to increased SPP levels, which suppress apoptosis (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 2910-2916).

Furthermore, the SPHK pathway, through the generation of SPP, is critically involved in mediating TNF- α -induced endothelial cell activation (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J., and Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, (1998), 14196-14201) and the ability of high density lipoproteins (HDL) to inhibit cytokine-induced adhesion molecule expression has been correlated with its ability to reset this sphingolipid rheostat (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y.,

Bert, A.G., Barter, P.J., and Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, (1998), 14196-14201). This has important implications for the protective function of HDL against the development of atherosclerosis and associated coronary heart disease. Recent data has also connected the sphingolipid rheostat to allergic responses (Prieschl, E., E., Csonga, R., Novotny, V., Kikuchi, G. E., and Baumruker, T., J. Exp. Med., **190**, (1999), 1-8).

Interest in SPP has accelerated recently with the discovery that it is a ligand of the G-protein coupled cell surface receptor EDG-1 (Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., and Spiegel, S., J. Cell Biol., **142**, (1998), 229-240; Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., and Hla, T., Science, **279**, (1998), 1552-1555). This rapidly led to the identification of several other related receptors, named EDG-3, -5, -6, and -8, which are also specific SPP receptors (Goetzl, E. J., and An, S., FASEB J., **12**, (1998), 1589-1598; Spiegel, S., and Milstein, S., Biochem. Biophys. Acta., **1484**(2-3):107-16, (2000)).

Sphinganine-1-phosphate, which is structurally similar to SPP and lacks only the trans double bond at the 4-position, but not lysophosphatidic acid or sphingosylphosphorylcholine, also binds to these receptors (Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., **274**, (1999) 4626-4632), demonstrating that EDG-1 belongs to a family of G-protein coupled receptors that bind SPP with high affinity and specificity (Goetzl, E. J. and An, S., FASEB J., **12**, (1998), 1589-1598; Spiegel, S. and Milstien, S., Biochem. Biophys. Acta., **1484**(2-3):107-16, (2000)).

The EDG-1 family of receptors are differentially expressed, mainly in the cardiovascular and nervous systems, and are coupled to a variety of G-proteins and thus can regulate diverse signal transduction pathways culminating in

18

pleiotropic responses depending on the cell type and relative expression of EDG receptors. Although the biological functions of the EDG-1 family of GPCRs are not completely understood, recent studies suggest that binding of SPP to EDG-1 stimulates migration and chemotaxis (Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., and Spiegel, S. J. Biol. Chem., **274**, (1999), 35343-35350; English, D., Kovala, A. T., Welch, Z., Harvey, K. A., Siddiqui, R. A., Brindley, D. N., and Garcia, J. G., J. Hematother. Stem Cell Res., **8**, (1999), 627-634), and as a consequence, may regulate angiogenesis (Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., and Spiegel, S. J. Biol. Chem., **274**, (1999), 35343-35350; Lee, O. H., Kim, Y. M., Lee, Y. M., Moon, E. J., Lee, D. J., Kim, J. H., Kim, K. W., and Kwon, Y. G., Biochem. Biophys. Res. Commun., **264**, (1999) 743-750; Lee, M. J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellini, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi, Sha'afi, R. I., and Hla, T., Cell, **92**, (1999), 301-312). EDG-5 may play a role in cytoskeletal reorganization during neurite retraction, which is important for neuronal differentiation and development (Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., **274**, (1999), 4626-4632; MacLennan, A. J., Marks, L., Gaskin, A. A., and Lee, N., Neuroscience, **79**, (1997), 217-224).

Critical evaluation of the role of SPP requires cloning of the enzymes that regulate its metabolism. Recently, rat kidney SPHK has been purified to apparent homogeneity (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 12576-12583) and subsequently the first mammalian SPHK, designated mSPHK1 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 23722-23728) was cloned. Independently, two genes, termed LCB4 and LCB5, were also shown to code for SPHKs in *Saccharomyces cerevisiae* (Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. Z., Lester, R. L., and Dickson, R. C.,

19

J. Biol. Chem., 273, (1998) 19437-19442). Moreover, databases identify homologues of mSPHK1 in numerous widely disparate organisms, including worms, plants and mammals, demonstrating that the enzyme is encoded by a member of a highly conserved gene family (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728). Comparison of the predicted amino acid sequences of the known SPHK1s revealed five blocks of highly conserved amino acids (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728). However, several lines of evidence indicate that there may be multiple mammalian SPHK isoforms.

The finding that SPHK activity in platelets could be chromatographically fractionated into several forms with differing responses to detergents and inhibition by known SPHK inhibitors, indicate the presence of multiple enzyme forms in human platelets (Banno, Y., Kato, M., Hara, A., and Nozawa, Y., Biochem. J., 335, (1998), 301-304). Moreover, homology searches against a comprehensive nonredundant database revealed that several of the expressed sequence tags (dbEST) at NCBI had significant homology to conserved domains of mSPHK1a (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728), yet had substantial sequence differences.

USP 5,374,616 concerns compositions containing sphingosylphosphorylcholine for promoting cellular proliferation of mammalian cells.

WO 99/61581 describes DNA fragments which encoded murine sphingosine SPHK1a (381 amino acids) and SPHK1b (388 amino acids).

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to provide isolated and purified DNAs which encode mammalian (such as a mouse or human) sphingosine kinase type 2 isoforms and peptides

20

encoded therefrom.

It is a further object of the present invention to provide recombinant DNA constructs comprising a vector and the above described DNAs and host cells transformed with such recombinant DNA constructs.

It is a still further object of the present invention to furnish a method for producing mouse and human sphingosine type 2 isoform peptides by culturing such host cells.

It is an additional object of the present invention to provide a method for detecting an agent or a drug which inhibits or promotes sphingosine kinase activity.

It is yet another object of the present invention to provide a method for regulating a biological process; for treating or ameliorating a disease resulting from increased or decreased cell proliferation or increased or decreased cell death; and for treating or ameliorating a disease resulting from abnormal migration or motility of cells such as cancer, restenosis or diabetic neuropathy.

The present invention is also directed to an isolated and purified DNA which encodes a peptide of a sphingosine kinase type 2 isoform, the DNA comprising a sequence selected from the group consisting of the sequence of Genbank Accession No. bankit325787 and the sequence of Genbank Accession No. bankit325752.

The present invention also concerns methods for detecting an agent or a drug which inhibits or promotes sphingosine kinase type 2 activity comprising:

- (a) providing a recombinant DNA construct as discussed above, into a cell such that sphingosine kinase type 2 isoform is produced in the cell;
- (b) adding at least one drug or agent to the cell, and
- (c) detecting whether or not the drug or agent inhibits or promotes sphingosine kinase type 2 activity by measuring sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids in the cells and comparing the resultant measurement to a control

which did not receive the drug or agent, wherein a decrease in the amount of sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids as compared to the control indicates an inhibitory drug or agent, or an increase in the amount of sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids in the cell as compared to the control indicates a stimulatory drug or agent.

As described hereinabove, the present invention also relates to methods of regulating a biological process (such as mitogenesis, apoptosis, neuronal development, chemotaxis, angiogenesis and inflammatory responses) in a mammal comprising administering to a mammal (such as a human) in need thereof, a pharmaceutically effective amount of a peptide as described above.

Also as described hereinabove, the present invention is further directed to methods for the treatment or amelioration of a disease resulting from increased cell death or decreased cell proliferation, comprising administering to a mammal (such as a human) in need thereof, a pharmaceutically effective amount of a peptide as described above.

Further as described above, the present invention also relates to methods for the treatment or administration of a disease resulting from decreased cell death or increased cell proliferation comprising administering to a mammal (such as a human) in need thereof, a pharmaceutically effective amount of an antibody to a peptide as described above.

Additionally as described above, the present invention further concerns methods for treatment or amelioration of a disease resulting from abnormal migration or motility of cells selected from the group consisting of cancer, restenosis and diabetic neuropathy, the method comprising administering to a mammal (such as a human) in need thereof, a pharmaceutically effective amount of an antibody to a peptide as described above.

The present invention further relates to compositions for (a) regulating biological processes, (b) treating or

ameliorating diseases resulting from increased cell death or decreased cell proliferation, (c) treating or ameliorating diseases resulting from decreased cell death or increased cell proliferation, or (d) treating or ameliorating diseases resulting from abnormal migration or motility of cells (such as cancer, restenosis and diabetic neuropathy) comprising (i) a pharmaceutically effective amount of a peptide as described above or an antibody to such peptide as described above, and (ii) a pharmaceutically acceptable carrier.

The present invention also involves a method for screening agents or drugs which reduce or eliminate sphingosine kinase type 2 activity, the method comprising detecting a decrease in sphingosine kinase type 2 enzyme activity in the presence of the agent or drug.

Furthermore, the present invention is directed to a method for detecting the presence of sphingosine kinase type 2 isoform in a sample comprising:

- (i) contacting a sample with antibodies which recognize sphingosine kinase type 2; and
- (ii) detecting the presence or absence of a complex formed between sphingosine kinase type 2 and antibodies specific therefor.

The present invention also concerns a method for detecting sphingosine kinase type 2 in a sample comprising subjecting the sample to a polymerase chain reaction and detecting for the presence of sphingosine kinase type 2.

The present invention is additionally directed to a diagnostic kit for detecting sphingosine kinase type 2 RNA/cDNA in a sample comprising primers or oligonucleotides specific for sphingosine kinase type 2 RNA or cDNA suitable for hybridization to sphingosine kinase type 2 RNA or cDNA and/or amplification of sphingosine kinase type 2 sequences and suitable ancillary reagents.

Sphingosine kinase catalyzes the phosphorylation of sphingosine to yield SPP. Based on sequence homology to murine

and human sphingosine kinase-1 (SPHK1), which was recently cloned (Kohama, et al., *J. Biol. Chem.*, 273, 23722-23728, (1998)), the present invention is directed to the cloning, functional characterization, and tissue distribution of a second type of mouse and human sphingosine kinase (mSPHK2 and hSPHK2).

mSPHK2 and hSPHK2 of the present invention encode proteins of 617 and 618 amino acids, respectively, both much larger than SPHK1, and both contain the conserved domains previously found in SPHK1, but their sequences diverge considerably in the centers and at the amino termini. Northern blot analysis of multiple human and murine tissues revealed that SPHK2 mRNA expression was strikingly different from that of SPHK1 and was highest in brain, heart, kidney, testes, and liver. Whereas SPHK1 expression is greatest at mouse embryonic day 7, SPHK2 expression is only detectable at embryonic day 11 and increases thereafter.

Human embryonic 293 kidney cells transiently transfected with mSPHK2 or hSPHK2 expression vectors had marked increases in SPHK activity resulting in elevated SPP levels. Notably, SPHK2 had somewhat different substrate specificity than SPHK1. D-erythro-sphinganine (dihydrosphingosine, DHS) was an even better substrate than D-erythro-sphingosine for SPHK2, while DHS was a potent inhibitor of SPHK1.

SPHK2 also catalyzed the phosphorylation of phytosphingosine and D, L-threo-dihydrosphingosine, albeit to a lesser extent. DHS, a competitive inhibitor of SPHK1, surprisingly was a non-competitive inhibitor of SPHK2. Although increasing ionic strength inhibited SPHK1, KCl and NaCl markedly stimulated SPHK2 activity. Moreover, Triton X-100 and BSA inhibited SPHK2, in contrast to their effects on SPHK1, whereas phosphatidylserine stimulated both types. The data herein indicate that SPHK2 is a novel member of this growing class of lipid kinases, which is important in the regulation of diverse biological processes, including

mitogenesis, apoptosis, neuronal development, chemotaxis, angiogenesis, and inflammatory responses.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

For the purposes of illustrating the invention, features, aspects and advantages are shown in the drawings. It is to be understood, however, that the present invention is not limited to that which is depicted in the drawings

Fig. 1A shows predicted amino acid sequences of murine and human type 2 sphingosine kinase based on non-ClustalW alignment of the predicted amino acid sequences of ("mSPHK2") and human sphingosine kinase 2 ("hSPHK2"). Identical and conserved amino acid substitutions are shaded dark and light gray, respectively. The dashes represent gaps in sequences and numbers on the right refer to the amino acid sequence of mSPHK2. The conserved domains (C1 to C5) are indicated by lines.

Fig. 1B is a schematic representation of conserved regions of SPHK1 and SPHK2. The primary sequence of mSPHK2 is compared to that of mSPHK1a.

Figs. 2A, 2B and 2C are Northern blots which show the tissue specific expression of type 1 and type 2 sphingosine kinase.

In Fig. 2A, mSPHK2 (upper panel) and mSPHK1a (middle panel) probes were end labeled and hybridized to poly(A)+ RNA blots from the indicated mouse tissues as described hereinbelow. Lanes: 1, heart; 2, brain; 3, spleen; 4, lung; 5, liver; 6, skeletal muscle; 7, kidney; 8, testis. A β -actin probe (lower panel) was used as a loading control.

Fig. 2B shows the tissue specific expression of hSPHK2. Lanes 1, brain; 2, heart; 3, skeletal muscle; 4, colon; 5, thymus; 6, spleen; 7, kidney; 8, liver; 9, small intestine; 10, placenta; 11, lung; 12, leukocyte.

Fig. 2C shows the expression of mSPHK1a and mSPHK2 during mouse embryonic development. Poly(A)+ RNA blots from days 7,

11, 15 and 17 mouse embryos were probed as in Fig. 2A.

Figs. 3A and 3B are graphs which show the enzymatic activity of recombinant SPHK2.

In Fig. 3A, HEK 293 cells were transiently transfected with an empty vector or with mSPHK2 or hSPHK2 expression vectors. After 24 hours, SPHK activity was measured in cytosol (open bars) and particulate fractions (filled bars). The data are means $\pm$ S.D. Parental and vector-transfected cells had basal SPHK activities of 26 and 37 pmol/min/mg, respectively.

Fig. 3B shows the changes in mass levels of SPP after transfection with SPHK2. Mass levels of SPP in HEK293 cells transfected with an empty vector (open bars) or with mSPHK2 (filled bars) or with hSPHK2 (hatched bars) were measured as described hereinbelow. The data are expressed as pmol/nmol phospholipid.

Figs. 4A to 4D are graphs which show the substrate specificity of mSPHK2.

Fig. 4A is a graph which shows SPHK-dependent phosphorylation of various sphingosine analogs or other lipids (50 mM) which was measured in cytosol from HEK293 cells transfected with mSPHK2. Lanes: 1, D-erythro-sphingosine ("D-erythro-Sph"); 2, D-erythro-dihydrosphingosine ("D-erythro-DHS"); 3, D, L-threo-DHS; 4, N,N-dimethylsphingosine ("DMS"); 5, C2-ceramide; 6, C16-ceramide; 7, diacylglycerol; 8, phosphatidylinositol; 9, phytosphingosine. Data are expressed as percentage of phosphorylation of D-erythro-Sph.

Figs. 4A to 4D are graphs which show the noncompetitive inhibition of recombinant SPHK2 by N,N-dimethylsphingosine.

Fig. 4B shows the dose-dependent inhibition of mSPHK2 by DMS. SPHK activity in HEK293 cell lysates after transfection as in Fig. 4A was measured with 10 μ M D-erythro-sphingosine in the presence of increasing concentrations of DMS.

Fig. 4C shows a kinetic analysis of DMS inhibition. SPHK activity was measured with varying concentrations of D-erythro-sphingosine in the absence (open circles) or presence of 10 μ M (filled squares) or 20 μ M DMS (filled triangles).

Fig. 4D are Lineweaver-Burk plots. The K_m for D-erythro-sphingosine was 3.4 μ M. The K_i value for DMS was 12 μ M.

Figs. 5A to 5E are graphs which show the pH dependence and salt effects on mSPHK2.

Fig. 5A shows cytosolic SPHK2 activity in transfected HEK 293 cells that was measured in a kinase buffer with the pH adjusted using the following buffers: 200 mM sodium acetate (pH 4.5-5.5, open circles); 200 mM MES (pH 6-7, filled circles); 200 mM potassium phosphate (pH 6.5-8, open squares); 200 mM HEPES (pH 7-7.5, filled squares); 200 mM Tris-HCl (pH 7.5-9, open triangles); and 200 mM borate (pH 10, filled triangle).

Figs. 5B to 5E show that salts stimulate SPHK2, but inhibit SPHK1.

In Figs. 5B and 5C, the SPHK activity in HEK293 cell lysates was measured 24 hours after transfection with mSPHK1 (Fig. 5B) or mSPHK2 (Fig. 5C) in the absence or presence of increasing concentrations of NaCl (open squares) or KCl (filled circles).

Fig. 5D shows a kinetic analysis of SPHK2 activation by KCl. mSPHK2 activity was measured with varying concentrations of D-erythro-sphingosine in the absence (open circles), or presence of 50 mM KCl (open squares), or 200 mM KCl (filled squares).

Fig. 5E are Lineweaver-Burk plots of data from Fig 5D. The K_m value not affected by the presence of KCl. V_{max} values were 0.1, 0.3 and 1 (nmol/min/mg) in the presence of 0, 50, and 200 mM KCl, respectively.

Figs. 6A to 6B are graphs which show that Triton X-100 and bovine serum albumin ("BSA") have differential effects on the activity of SPHK1 and SPHK2. HEK293 cells were transfected

with mSPHK1a (open circles) or mSPHK2 (filled circles) and the activities of each in cell lysates were measured after 24 hours in the presence of the indicated concentrations of Triton X-100 (Fig. 6A) or BSA (Fig. 6B).

Fig. 6C is a graph which shows that phosphatidylserine has similar effects on the activity of SPHK1 and SPHK2. HEK293 cells were transfected with mSPHK1a (circles) or mSPHK2 (triangles) and the activities of each in cell lysates were measured after 24 hours in the presence of the indicated concentrations of phosphatidylserine (filled symbols) or phosphatidylcholine (open symbols). Data are expressed as percentage of control activity measured without any additions.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In one embodiment, the present invention relates to a DNA or cDNA segment which encodes mammalian (such as mouse and human) sphingosine kinase type 2 isoforms.

In addition, isolated nucleic acid molecules of the invention include DNA molecules which comprise sequences substantially different from those described above but which, due to the degeneracy of the genetic code, still encode mammalian sphingosine kinase type 2 isoforms. Of course, the genetic code and species-specific codon preferences are well known in the art. Thus, it would be routine for one of ordinary skill in the art to generate the degenerate variants described above, for instance, to optimize codon expression for a particular host (e.g., change codons in the human mRNA to those preferred by a bacterial host such as *E.coli*).

Nucleic acid molecules of the present invention may be in the form of RNA, such as mRNA, or in the form of DNA, including, for instance, cDNA and genomic DNA obtained by cloning or produced synthetically. The DNA may be double-stranded or single-stranded. Single-stranded DNA or RNA may be the coding strand, also known as the "sense strand", or it may be the noncoding strand, also referred to as the

"antisense strand".

By "isolated" nucleic acid molecule(s) is intended a nucleic acid molecule, DNA or RNA, which has been removed from its native environment. For example, recombinant DNA molecules contained in a vector are considered isolated for the purposes of the present invention. Further examples of isolated DNA molecules include recombinant DNA molecules maintained in heterologous host cells or purified (partially or substantially) DNA molecules in solution. Isolated RNA molecules include *in vivo* or *in vitro* RNA transcripts of the DNA molecules of the present invention. Isolated nucleic acid molecules according to the present invention further include such molecules produced synthetically.

The present invention is further directed to nucleic acid molecules encoding portions or fragments of the nucleotide sequences described herein. Fragments include portions of the nucleotide sequences of Fig. 1A for mSPHK2 and hSPHK2 at least 10 contiguous nucleotides in length selected from any two integers, one of which 5 representing a 5' nucleotide position and a second of which representing a 3' nucleotide position, where the first nucleotide for each nucleotide sequence in Fig. 1A is position 1. That is, every combination of a 5' and 3' nucleotide position that a fragment at least 10 contiguous nucleotide bases in length or any integer between 10 and the length of an entire nucleotide sequence of mSPHK2 or hSPHK2 of Fig. 1A minus 1.

Further, the present invention includes polynucleotides comprising fragments specified by size, in nucleotides, rather than by nucleotide positions. The present invention includes any fragment size, in contiguous nucleotides, selected from integers between 1 and the entire length of an entire nucleotide sequence minus 1. Preferred sizes include 20 to 50 nucleotides; sizes of 50 to 300 nucleotides are useful as primers and probes. Regions from which typical sequences may be derived include, but are not limited to, for example,

regions encoding specific epitopes or domains within said sequence, such as domains C1-C5 shown in Fig. 1A.

In another aspect, the invention provides isolated nucleic acid molecules comprising polynucleotides which hybridize under stringent hybridization conditions to a polynucleotide sequence 30 of the present invention described above, for instance, a nucleic acid sequence shown in Fig. 1A or a specified fragment thereof. By "stringent hybridization conditions" is intended overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% 35 formamide, 5X SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 g/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1X SSC at about 65°C.

The sequences encoding the polypeptides of the present invention or portions thereof may be fused to other sequences which provide additional functions known in the art such as a marker sequence, or a sequence encoding a peptide which facilitates purification of the fused polypeptide, peptides having antigenic determinants known to provide helper T-cell stimulation, peptides encoding sites for post-translational modifications, or amino acid sequences in which target the fusion protein to a desired location, e.g., a heterologous leader sequence.

The present invention further relates to variants of the nucleic acid molecules of the present invention, which encode portions, analogs or derivatives of the sphingosine kinase type 2 isoform polypeptides shown in Fig. 1A. Variants may occur naturally, such as a natural allelic variant. By an "allelic variant" is intended one of several alternate forms of a gene occupying a given locus of a chromosome of an organism. Non-naturally occurring variants may be produced by known mutagenesis techniques. Such variants include those produced by nucleotide substitution, deletion or addition of one or more nucleotides in the coding or noncoding regions or both.

Alterations in the coding regions may produce conservative or nonconservative amino acid substitutions, deletions, or additions. Especially preferred among these are silent substitutions, additions, and deletions which do not alter the properties and activities of sphingosine kinase type 2 isoform polypeptides disclosed herein or portions thereof. Also preferred in this regard are conservative substitutions.

Nucleic acid molecules with at least 90-99% identity to a nucleic acid molecule which encodes a sphingosine kinase type 2 isoform shown in Fig. 1A is another aspect of the present invention. These nucleic acids are included irrespective of whether they encode a polypeptide having sphingosine kinase activity. By "a polypeptide having sphingosine kinase type 2 activity" is intended polypeptides exhibiting activity similar, but not identical, to an activity of the sphingosine kinase type 2 isoform of the present invention, as measured in the assays described below. The biological activity or function of the polypeptides of the present invention are expected to be similar or identical to, polypeptides from other organisms that share a high degree of structural identity/similarity.

In another embodiment, the present invention relates to a recombinant DNA molecule that includes a vector and a DNA sequence as described above. The vector can take the form of a plasmid, phage, cosmid, YAC, an eukaryotic expression vector such as a DNA vector, *Pichia pastoris*, or a virus vector such as for example, baculovirus vectors, retroviral vectors or adenoviral vectors, and others known in the art. The cloned gene may optionally be placed under the control of (i.e., operably linked to) certain control sequences such as promoter sequences, or sequences which may be inducible and/or cell type-specific. Suitable promoters are known to a person with ordinary skill in the art. The expression construct will further contain sites for transcription initiation, termination and, in the transcribed region, a ribosome binding site for translation. Among the vectors preferred for use include

pcMV-SPORT2 (Life Technologies, Inc.), pcDNA3 (Invitrogen), to name a few.

Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, electroporation, infection, and other methods known in the art and described in standard laboratory manuals such as Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al. (Eds), Wiley & Sons, Inc. All documents cited herein supra and infra are hereby incorporated in their entirety by reference thereto.

In a further embodiment, the present invention relates to host cells stably transformed or transfected with the above-described recombinant DNA constructs. The host cell can be prokaryotic (for example, bacterial), lower eukaryotic (for example, yeast or insect) or higher eukaryotic (for example, all mammals, including, but not limited to, rat and human).

Both prokaryotic and eukaryotic host cells may be used for expression of desired coding sequences, when appropriate control sequences which are compatible with the designated host are used. Among prokaryotic hosts, *E. coli* is most frequently used. Expression control sequences for prokaryotes include promoters, optionally containing operator portions, and ribosome binding sites. Transfer vectors compatible with prokaryotic hosts are commonly derived from, for example, pBR322, a plasmid containing operons conferring ampicillin and tetracycline resistance, and the various pUC vectors, which also contain sequences conferring antibiotic resistance markers. These markers may be used to obtain successful transformants by selection. See, for example, Maniatis, Fitch and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982) or DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985) for general cloning methods.

A transformant having a plasmid in which a cDNA encoding human SPHK2 is inserted, namely *E. coli* pCR3.1-hSPHK2 SANK 70200 has been deposited with the National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science

and Technology, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japan, accession number FERM BP-7110, deposited March 29, 2000.

The DNA sequence can be present if the vector operably linked to a sequence encoding an IgG molecule, an adjuvant, a carrier, or an agent for aid in purification of SPHK, such as glutathione S-transferase, or a series of histidine residues also known as a histidine tag. The recombinant molecule can be suitable for transfecting eukaryotic cells, for example, mammalian cells and yeast cells in culture systems. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, and *Pichia pastoris* are the most commonly used yeast hosts, and are convenient fungal hosts. Control sequences for yeast vectors are known in the art. Mammalian cell lines are available as hosts for expression are known in the art and include many immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC), such as HEK293 cells, and NIH 3T3 cells, to name a few. Suitable promoters are also known in the art and include viral promoters such as that from SV40, Rous sarcoma virus ("RSV"), adenovirus ("ADV"), bovine papilloma virus ("BPV"), and cytomegalovirus ("CMV").

Mammalian cells may also require terminator sequences and poly A addition sequences; enhancer sequences which increase expression may also be included, and sequences which cause amplification of the gene may also be desirable. These sequences are known in the art.

The transformed or transfected host cells can be used as a source of DNA sequences described above. When the recombinant molecule takes the form of an expression system, the transformed or transfected cells can be used as a source of the protein described below.

In another embodiment, the present invention relates to the employment of nucleotide sequences corresponding to GenBank/EMBL Data Bank accession nos. bankit325787 and bankit325752.

A polypeptide or amino acid sequence expressed from the nucleotide sequences discussed above, refers to polypeptide having an amino acid sequence identical to that of a polypeptide encoded from the sequence, or a portion thereof wherein the portion contains at least 2 to 5 amino acids, and more preferably at least 8 to 10 amino acids, and even more preferably at least 15 amino acids, or which is immunologically identifiable with a polypeptide encoded in the sequence.

A recombinant or derived polypeptide is not necessarily translated from a designated nucleic acid sequence; it may be generated in any manner, including, for example, chemical synthesis, or expression of a recombinant expression system. In addition the polypeptide can be fused to other proteins or polypeptides which increase its antigenicity, such as adjuvants, for example.

As noted above, the methods of the present invention are suitable for production of any polypeptide of any length, via insertion of the above-described nucleic acid molecules or vectors into a host cell and expression of the nucleotide sequence encoding the polypeptide of interest by the host cell. Introduction of the nucleic acid molecules or vectors into a host cell to produce a transformed host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, infection or other methods. Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as in Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology, (1986).

Once transformed host cells have been obtained, the cells may be cultivated under any physiologically compatible conditions of pH and temperature, in any suitable nutrient medium containing assimilable sources of carbon, nitrogen and essential minerals that support host cell growth. Recombinant polypeptide-producing cultivation conditions vary according to the type of vector used to transform the host cells. For

example, certain expression vectors comprise regulatory regions which require cell growth at certain temperatures, or addition of certain chemicals or inducing agents to the cell growth medium, to initiate the gene expression resulting in the production of the recombinant polypeptide. Thus, the term "recombinant polypeptide-producing conditions," as used herein, is not meant to be limited to any one set of cultivation conditions. Appropriate culture media and conditions for the above-described host cells and vectors are well-known in the art. Following its production in the host cells, the polypeptide of interest may be isolated by several techniques. To liberate the polypeptide of interest from the host cells, the cells are lysed or ruptured. This lysis may be accomplished by contacting the cells with a hypotonic solution, by treatment with a cell wall-disrupting enzyme such as lysozyme, by sonication, by treatment with high pressure, or by a combination of the above methods. Other methods of bacterial cell disruption and lysis that are known to one of ordinary skill may also be used.

Following disruption, the polypeptide may be separated from the cellular debris by any technique suitable for separation of particles in complex mixtures. The polypeptide may then be purified by well-known isolation techniques. Suitable techniques for purification include, but are not limited to, ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, electrophoresis, immunoadsorption, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, size exclusion chromatography, liquid chromatography (LC), high performance LC (HPLC), fast performance LC (FPLC), hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography.

The recombinant or fusion protein can be used as a diagnostic tool and in a method for producing sphingosine-1-phosphate, detectably labeled and unlabeled, and

35

in a method for measuring levels of SPP in samples as described below. In addition, the recombinant protein can be used as a therapeutic agent to reduce cell death and/or increase cell proliferation. The transformed host cells can be used to analyze the effectiveness of drugs and agents which inhibit SPHK2 function, such as host proteins or chemically derived agents or other proteins which may interact with the cell to down-regulate or alter the expression of SPHK2, or its cofactors.

In another embodiment, the present invention relates to monoclonal or polyclonal antibodies specific for the above-described recombinant proteins (or polypeptides). For instance, an antibody can be raised against a peptide described above, or against, a portion thereof of at least 10 amino acids, preferably 11 to 15 amino acids. Persons with ordinary skill in the art using standard methodology can raise monoclonal and polyclonal antibodies to the protein (or polypeptide) of the present invention, or a unique portion thereof. Material and methods for producing antibodies are well known in the art (see, for example, Goding in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Chapter 4, 1986).

The level of expression of sphingosine kinase type 2 can be detected at several levels. Using standard methodology well known in the art, assays for the detection and quantitation of sphingosine kinase type 2 RNA can be designed and include northern hybridization assays, *in situ* hybridization assays, and PCR assays, among others. See, for example, Maniatis, Fritsch and Sambrook, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, (1982) or DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985), or Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al., (Eds), Wiley & Sons, Inc. for a general description of methods for nucleic acid hybridization.

Polynucleotide probes for the detection of sphingosine kinase type 2 RNA can be designed from the sequence available at accession numbers AF068748 and/or AF068749 for the mouse

sequence (Kohama, T., et al., J. Biol. Chem., 273:23722-23728). For example, RNA isolated from samples can be coated onto a surface such as a nitrocellulose membrane and prepared for northern hybridization. In the case of *in situ* hybridization of biopsy samples, for example, the tissue sample can be prepared for hybridization by standard methods known in the art and hybridized with polynucleotide sequences which specifically recognize sphingosine kinase type 2 RNA. The presence of a hybrid formed between the sample RNA and the polynucleotide can be detected by any method known in the art such as radiochemistry, or immunochemistry, to name a few.

One of skill in the art may find it desirable to prepare probes that are fairly long and/or encompass regions of the amino acid sequence which would have a high degree of redundancy in the corresponding nucleic acid sequences. In other cases, it may be desirable to use two sets of probes simultaneously, each to a different region of the gene. While the exact length of any probe employed is not critical, typical probe sequences are no greater than 500 nucleotides, even more typically they are no greater than 250 nucleotides; they may be no greater than 100 nucleotides, and also may be no greater than 75 nucleotides in length. Longer probe sequences may be necessary to encompass unique polynucleotide regions with differences sufficient to allow related target sequences to be distinguished. For this reason, probes are preferably from about 10 to about 100 nucleotides in length and more preferably from about 20 to about 50 nucleotides.

The DNA sequence of sphingosine kinase type 2 can be used to design primers for use in the detection of sphingosine kinase type 2 using the polymerase chain reaction (PCR) or reverse transcription PCR (RT-PCR). The primers can specifically bind to the sphingosine kinase type 2 cDNA produced by reverse transcription of sphingosine kinase type 2 RNA, for the purpose of detecting the presence, absence, or quantifying the amount of sphingosine kinase type 2 by

32

comparison to a standard. The primers can be any length ranging from 7 to 40 nucleotides, preferably 10 to 35 nucleotides, most preferably 18 to 25 nucleotides homologous or complementary to a region of the sphingosine kinase type 2 sequence.

Reagents and controls necessary for PCR or RT-PCR reactions are well-known in the art. The amplified products can then be analyzed for the presence or absence of sphingosine kinase type 2 sequences, for example, by gel fractionation, by radiochemistry, and immunochemical techniques. This method is advantageous, since it requires a small number of cells. Once sphingosine kinase type 2 is detected, a determination of whether the cell is overexpressing or underexpressing sphingosine kinase type 2 can be made by comparison to the results obtained from a normal cell using the same method. Increased sphingosine kinase type 2 RNA levels correlate with increased cell proliferation and reduced cell death.

In another embodiment, the present invention relates to a diagnostic kit for the detection of sphingosine kinase type 2 RNA in cells. The kit comprises a package unit having one or more containers of sphingosine kinase type 2 oligonucleotide primers for detection of sphingosine kinase type 2 by PCR or RT-PCR or sphingosine kinase type 2 polynucleotides for the detection of sphingosine kinase type 2 RNA in cells by *in situ* hybridization or Northern analysis, and in some kits including containers of various reagents used for the method desired. The kit may also contain one or more of the following items: polymerization enzymes, buffers, instructions, controls, detection labels. Kits may include containers of reagents mixed together in suitable proportions for performing the methods in accordance with the invention. Reagent containers preferably contain reagents in unit quantities that obviate measuring steps when performing the subject methods.

In a further embodiment, the present invention provides a method for identifying and quantifying the level of sphingosine

kinase type 2 present in a particular biological sample. Any of a variety of methods which are capable of identifying (or quantifying) the level of sphingosine kinase type 2 in a sample can be used for this purpose.

Diagnostic assays to detect sphingosine kinase type 2 may comprise biopsy or *in situ* assay of cells from an organ or tissue sections, as well as an aspirate of cells from a tumor or normal tissue. In addition, assays may be conducted upon cellular extracts from organs, tissues, cells, urine, or serum or blood or any other body fluid or extract.

When assaying a biopsy, the assay will comprise contacting the sample to be assayed with a sphingosine kinase type 2 ligand, natural or synthetic, or an antibody, polyclonal or monoclonal, which recognizes sphingosine kinase type 2, or an antiserum capable of detecting sphingosine kinase type 2, and detecting the complex formed between sphingosine kinase type 2 present in the sample and the sphingosine kinase type 2 ligand or antibody added.

Sphingosine kinase type 2 ligands or substrates include for example, sphingosine, in addition to natural and synthetic classes of ligands and their derivatives which can be derived from natural sources such as animal or plant extracts. Other sphingosine kinase type 2 ligands include calmodulin.

Sphingosine kinase type 2 ligands or anti-sphingosine kinase type 2 antibodies, or fragments of ligand and antibodies capable of detecting sphingosine kinase type 2 may be labeled using any of a variety of labels and methods of labeling for use in diagnosis and prognosis of disease associated with increased cell proliferation, such as cancer, or reduced cell death. Examples of types of labels which can be used in the present invention include, but are not limited to enzyme labels, radioisotopic labels, nonradioactive isotopic labels, and chemiluminescent labels.

Examples of suitable enzyme labels include malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid

isomerase, yeast-alcohol dehydrogenase, alpha-glycerol phosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase, peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate hydrogenase, glucoamylase, acetylcholine esterase, etc.

Examples of suitable radioisotopic labels

include ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{57}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{21}Cl , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{105}Pd , ^{11}C , ^{19}F and ^{131}I .

Examples of suitable non-radioactive isotopic

labels include ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{153}Dy , ^{52}Tr and ^{46}Fe .

Examples of suitable fluorescent labels include a ^{152}Eu label, a fluorescein label, an isothiocyanate I label, a rhodamine label, a phycoerythrin label, a phycocyanin label, an allophycocyanin label and a fluorescamine label.

Examples of chemiluminescent labels include a luminal label, an isoluminal label, an aromatic acridinium ester label, an imidazole label, an acridinium salt label, an oxalate ester label, a luciferin label and a luciferase label.

Those of ordinary skill in the art will know of other suitable labels which may be employed in accordance with the present invention. The binding of these labels to ligands and to antibodies or fragments thereof can be accomplished using standard techniques commonly known to those of ordinary skill in the art. Typical techniques are described by Kennedy, J. R., et al., (1976), Clin. Chem. Acta., 70, 1-31, and Schurs, A. H. W. M., et al., (1977), Clin. Chem. Acta., 81, 1-40. Coupling techniques mentioned in the latter are the glutaraldehyde method, the periodate method, the daleimide method, and others.

The detection of the antibodies (or fragments of antibodies) of the present invention can be improved by the use of carriers. Well-known carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses, and

40

magnetite. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration, so long as the coupled molecule is capable of binding to sphingosine kinase type 2. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet or test strip. Those of ordinary skill in the art will know many other suitable carriers for binding monoclonal antibody, or will be able to ascertain the same by the use of routine experimentation.

The ligands or antibodies, or fragments of antibodies or ligands of sphingosine kinase type 2 discussed above may be used to quantitatively or qualitatively detect the presence of sphingosine kinase type 2. Such detection may be accomplished using any of a variety of immunoassays known to persons of ordinary skill in the art such as radioimmunoassays, immunometric assays, etc. Using standard methodology well known in the art, a diagnostic assay can be constructed by coating on a surface (i.e., a solid support) for example, a microtitration plate or a membrane (e.g., a nitrocellulose membrane), antibodies specific for sphingosine kinase type 2 or a portion of sphingosine kinase type 2, and contacting it with a sample from a person suspected of having a sphingosine kinase type 2 related disease. The presence of a resulting complex formed between sphingosine kinase type 2 in the sample and antibodies specific therefor can be detected by any of the known detection methods common in the art, such as fluorescent antibody spectroscopy or colorimetry. A good description of a radioimmune assay may be found in Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology by Work, T.S., et al., North Holland Publishing Company, N.Y. (1978), incorporated by reference herein. Sandwich assays are described by Wide at pages 199-206 of Radioimmune Assay Method, edited by Kirkham

and Hunter, E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970.

The diagnostic methods of this invention are predictive of proliferation and metastatic potentials in patients suffering from cancers including carcinomas of the lung, such as small cell carcinoma, large cell carcinoma, squamous carcinoma, and adenocarcinoma, stomach carcinoma, prostatic adenocarcinoma, ovarian carcinoma such as serous cystadenocarcinoma and mucinous cystadenocarcinoma, ovarian germ cell tumors, testicular carcinomas, and germ cell tumors, pancreatic adenocarcinoma, biliary adenocarcinoma, hepatocellular carcinoma, renal cell adenocarcinoma, endometrial carcinoma including adenocarcinomas and mixed Mullerian tumors (carcinosarcomas), carcinomas of the endocervix, ectocervix, and vagina such as adenocarcinoma and squamous carcinoma, basal cell carcinoma, melanoma, and skin appendage tumors, esophageal carcinoma, carcinomas of the nasopharynx and oropharynx including squamous carcinoma and adenocarcinomas, salivary gland carcinomas, brain and central nervous system tumors, including tumors of glial, neuronal, and meningeal origin, tumors of peripheral nerve, soft tissue sarcomas and sarcomas of bone and cartilage. Cells of these tumors which express increased levels of sphingosine kinase type 2, RNA or sphingosine kinase type 2 protein, have increased proliferation and decreased cell death.

The protein can be used to identify inhibitors of sphingosine kinase type 2 activity. Using an enzyme assay, natural and synthetic agents and drugs can be discovered which result in a reduction or elimination of sphingosine kinase type 2 enzymatic activity. Knowledge of the mechanism of action of the inhibitor is not necessary as long as a decrease in the activity of sphingosine kinase type 2 is detected. Inhibitors may include agents or drugs which either bind or sequester the enzyme's substrate(s) or cofactor(s), or inhibit the enzyme itself directly, for example, by irreversible binding of the agent or drug to the enzyme or indirectly, for example, by

introducing an agent which binds the sphingosine kinase type 2 substrate. Agents or drugs related to the present invention may result in partial or complete inhibition of sphingosine kinase type 2 activity.

Inhibitors of sphingosine kinase type 2 include DL-threo-dihydrosphingosine (DHS) and the more recently discovered inhibitor N,N-dimethylsphingosine ("DMS") described in Edsall, L. C. et al., (1998), Biochemistry, 37, 12892-12898. Inhibitors of sphingosine kinase type 2 may be used in the treatment or amelioration of diseases such as cancer, atherosclerosis, neurodegenerative disorders, i.e., stroke and Alzheimer's disease.

Agents which decrease the level of sphingosine kinase type 2 (i.e., in a human or an animal) or reduce or inhibit sphingosine kinase type 2 activity may be used in the therapy of any disease associated with the elevated levels of sphingosine kinase type 2 or diseases associated with increased cell proliferation, such as cancer. An increase in the level of sphingosine kinase type 2 is determined when the level of sphingosine kinase type 2 in a tumor cell is about 2 to 3 times the level of sphingosine kinase type 2 in the normal cell, up to about 10 to 100 times the amount of sphingosine kinase type 2 in a normal cell. Agents which decrease sphingosine kinase type 2 RNA include, but are not limited to, one or more ribozymes capable of digesting sphingosine kinase type 2 RNA, or antisense oligonucleotides capable of hybridizing to sphingosine kinase type 2 RNA, such that the translation of sphingosine kinase type 2 is inhibited or reduced resulting in a decrease in the level of sphingosine kinase type 2. These antisense oligonucleotides can be administered as DNA, as DNA entrapped in proteoliposomes containing viral envelope receptor proteins (Kanoda, Y. et al., (1989), Science, 5, 243, 375) or as part of a vector which can be expressed in the target cell such that the antisense DNA or RNA is made. Vectors which are expressed in particular cell types are known in the art, for

example, for the mammary gland. See Furth, J. Mammary Gland Biol. Neopl., 2, (1997), 373, for examples of conditional control of gene expression in the mammary gland.

Alternatively, the DNA can be injected along with a carrier. A carrier can be a protein such as a cytokine, for example, interleukin or a polylysine-glycoprotein carrier. Such carrier proteins and vectors and methods of using same are known in the art. In addition, the DNA could be coated onto tiny gold beads and such beads can be introduced into the skin with, for example, a gene gun (Ulmer, T. B. et al., Science, 259, (1993), 1745).

Alternatively, antibodies, or compounds capable of reducing or inhibiting sphingosine kinase type 2, that is reducing or inhibiting either the expression, production or activity of sphingosine kinase type 2, such as antagonists, can be provided as an isolated and substantially purified protein, or as part of an expression vector capable of being expressed in the target cell, such that the sphingosine kinase type 2 reducing or inhibiting agent is produced. In addition, co-factors such as various ions, i.e., Ca^{++} or factors which affect the stability of the enzyme can be administered to modulate the expression and function of sphingosine kinase type 2. These formulations can be administered by standard routes. In general, the combinations may be administered by the topical, transdermal, intraperitoneal, oral, rectal, or parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, or intramuscular) route. In addition, sphingosine kinase type 2 inhibiting compounds may be incorporated into biodegradable polymers being implanted in the vicinity of where drug delivery is desired, for example, at the site of a tumor so that the sphingosine kinase type 2 inhibiting compound is slowly released systemically. The biodegradable polymers and their use are described, for example, in detail in Brem et al., J. Neurosurg., 74, (1991), 441-446. These compounds are intended to be provided to recipient subjects in an amount sufficient to

effect the inhibition of sphingosine kinase type 2. Similarly, agents which are capable of negatively affecting the expression, production, stability or function of sphingosine kinase type 2, are intended to be provided to recipient subjects in an amount sufficient to effect the inhibition of sphingosine kinase type 2. An amount is said to be sufficient to "effect" the inhibition or induction of sphingosine kinase type 2 if the dosage, route of administration, etc., of the agent are sufficient to influence such a response.

In line with the function of sphingosine kinase type 2 in cell proliferation, agents which stimulate the level of sphingosine kinase type 2, such as agonists of SPHK2, may be used in the therapy of any disease associated with a decrease of SPHK2, or a decrease in cell proliferation, wherein SPHK2 is capable of increasing such proliferation, e.g., developmental retardation.

In providing a patient with agents which modulate the expression or function of sphingosine kinase type 2 to a recipient patient, the dosage of administered agent will vary depending upon such factors as the patient's age, weight, height, sex, general medical condition, previous medical history, etc. In general, it is desirable to provide the recipient with a dosage of agent which is in the range of from about 1 pg/kg to 10 mg/kg (body weight of patient), although a lower or higher dosage may be administered.

A composition is said to be "pharmacologically acceptable" if its administration can be tolerated by a recipient patient. Such an agent is said to be administered in a "therapeutically effective amount", if the amount administered is physiologically significant. An agent is physiologically significant if its presence results in a detectable change in the physiology of a recipient patient. The compounds of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby these materials, or their functional

VJ

derivatives, are combined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier vehicle. Suitable vehicles and their formulation, inclusive of other human proteins, e.g., human serum albumin, are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Osol, A. ed., Mack Easton PA. (1980). In order to form a pharmaceutically acceptable composition suitable for effective administration, such compositions will contain an effective amount of the above-described compounds together with a suitable amount of carrier vehicle.

Additional pharmaceutical methods may be employed to control the duration of action. Control release preparations may be achieved through the use of polymers to complex or absorb the compounds. The controlled delivery may be exercised by selecting appropriate macromolecules (for example, polyesters, polyamino acids, polyvinyl, pyrrolidone, ethylenevinylacetate, methylcellulose, carboxymethylcellulose, or protamine sulfate) and the concentration of macromolecules as well as the method of incorporation in order to control release. Another possible method to control the duration of action by controlled release preparations is to incorporate the compounds of the present invention into particles of a polymeric material, such as polyesters, polyamino acids, hydrogels, poly(lactic acid) or ethylene vinylacetate copolymers. Alternatively, instead of incorporating these agents into polymeric particles, it is possible to entrap these materials in microcapsules prepared, for example, interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose for gelatin-microcapsules and poly(methylmethacrylate)microcapsules, respectively, or in colloidal drug delivery systems, for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles, and nanocapsules or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

The present invention also provides kits for use in the diagnostic or therapeutic methods described above. Kits according to this aspect of the invention may comprise one or more containers, such as vials, tubes, ampules, bottles and the like, which may comprise one or more of the compositions of the invention.

The kits of the present invention may comprise one or more compounds or compositions of the present invention, and one or more excipients, diluents or adjuvants.

Having now described the present invention in detail, the same will be more clearly understood by reference to the following examples; which are included herewith for purposes of illustration only and are not intended to be limiting of the present invention.

The following Materials and Methods were used in the Examples described below.

EXAMPLES

Materials

SPP, sphingosine, and N,N-dimethylsphingosine were from Biomol Research Laboratory Inc. (Plymouth Meeting, PA). All other lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). [g-32P]ATP (3000 Ci/mmol) was purchased from Amersham (Arlington Heights, IL). Poly-L-lysine and collagen were obtained from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs (Beverly, MA). Poly(A)+ RNA blots of multiple mouse adult tissues were purchased from Clontech (Palo Alto, CA). "Lipofectamine PLUS" and "Lipofectamine" were obtained from Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD).

Example 1: cDNA Cloning of Murine Sphingosine Kinase Type 2 (mSPHK2)

BLAST searches of the EST database identified a mouse EST clone (GenBank accession number AA839233) which had significant

homology to conserved domains of mSPHK1a (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23721-23728), yet had substantial sequence differences. Using this EST, a second isoform of SPHK, denoted mSPHK2, was cloned by two different PCR approaches.

In the first approach, the method PCR cloning from a mouse cDNA library (Stratagene) was used. Approximately 1×10^4 phage were plated on twenty 150 mm plates, plaques were collected, and plasmids were isolated using standard procedures (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G., and Struhl, K., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York (1987)). An initial PCR reaction was carried out with a sequence specific primer (M-3-1, 5'-CCTGGGTGCACCTGCCCTGTATTGG (SEQ ID NO: 1)) and the M13 reverse primer. The longest PCR products were gel purified and used as the template for a second PCR which contained a sequence specific antisense primer (M-3-2, 5'-CCAGTCTTGGGGCAGTGGAGAGCC-3' (SEQ ID NO:2)) and the T3 primer. The final PCR products were subcloned using a "TOPO TA" cloning kit (Invitrogen) and then sequenced. Platinum high fidelity DNA polymerase (Life Technologies) was used for the PCR amplifications with the following cycling parameters: 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 45 seconds, and 70°C for 2 minutes with a final primer extension at 72°C for 5 minutes.

In a second approach, 5'RACE PCR was performed with the 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). Poly(A)+ RNA was isolated from Swiss 3T3 fibroblasts using a Quick Prep mRNA Purification kit (Pharmacia). The first strand cDNA was synthesized at 42°C for 50 minutes with 5 mg of Swiss 3T3 poly(A)+ RNA using a target antisense primer designed from the sequence of AAB39233 (m-GSP1, 5'-AGGTAGAGGCTTCTGG (SEQ ID NO:3)) and SuperScript II reverse transcriptase (Life

48

Technologies). Two consecutive PCR reactions using this cDNA as a template and LA Taq polymerase (TaKaRa) were carried out as follows: first PCR, 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, and primer extension at 72°C for 5 minutes with 5'RACE Abridged Anchor Primer, 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG (SEQ ID NO:4) and the target specific antisense primer m-GSP2, 5'-GCGATGGGTGAAAGCTGAGCTG (SEQ ID NO:5); for the second PCR, the same conditions were employed, except that the annealing temperature was 65°C, with Abridged Universal Amplification Primer (ADAP), 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC (SEQ ID NO:6) and m-GSP3, 5'-AGTCTCCAGTCAGCTCTGGACC (SEQ ID NO:7). PCR products were cloned into pCR2.1 and sequenced. The PCR products were subcloned into pCR3.1 and pcDNA 3 expression vectors.

Example 2: cDNA Cloning of Human Sphingosine Kinase-2 (hSPHK2)

Poly(A)⁺ RNA from HEK293 cells was used for a 5'RACE reaction. Target specific antisense primers (h-GSP1, 5'-CCCACTCACTCAGGCT (SEQ ID NO:8); h-GSP2, 5'-GAAGGACAGCCCAGCTTCAGAG (SEQ ID NO:9); and h-GSP3, 5'-ATTGACCAATAGAAGCAACC (SEQ ID NO:10)) were designed according to the sequence of a human EST clone (accession number AA295570). A first strand cDNA was synthesized with 5 µg of HEK293 mRNA and h-GSP1. This cDNA was used as a template in an initial PCR reaction using 5'RACE Abridged Anchor Primer and h-GSP2. Then, a nested PCR was carried out using the ADAP primer and h-GSP3. The resulting PCR products were cloned and sequenced as described above.

Example 3: Overexpression and Activity of SPHK2

Human embryonic kidney cells (HEK293, ATCC CRL-1573) and NIH 3T3 fibroblasts (ATCC CRL-1658) were cultured as described in Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., and Spiegel, S., J. Cell Biol., 147, (1999), 545-558. HEK293 cells were seeded at 6×10^5 per well in

poly-L-lysine coated 6 well plates. After 24 hours, cells were transfected with 1 µg of vector alone or with vectors containing sphingosine kinase constructs and 6 µl of "Lipofectamine PLUS" reagent plus 4 µl of "Lipofectamine" reagent per well. One to three days after transfection, cells were harvested and lysed by freeze-thawing as described in Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728. In some experiments, cell lysates were fractionated into cytosol and membrane fractions by centrifugation at 100,000 x g for 60 minutes. SPHK activity was determined in the presence of sphingosine, prepared as a complex with 4 mg/ml BSA, and [γ-32P]ATP in kinase buffer (Olivera, A. and Spiegel, S. in Methods in Molecular Biology, (Bird, I.M. ed.), (1998), Vol. 105, 233-242, Humana Press, Inc., Totowa, N.J.), containing 200 mM KCl, unless indicated otherwise. 32P-SPP was separated by TLC and quantified with a phosphorimager as previously described.

Example 4: Lipid Extraction and Measurement of SPP

Cells were washed with PBS and scraped in 1 ml of methanol containing 2.5 µl concentrated HCl. Lipids were extracted by adding 2 ml chloroform/1M NaCl (1:1, v/v) and 100 µl 3N NaOH and phases separated. The basic aqueous phase containing SPP, and devoid of sphingosine, ceramide, and the majority of phospholipids, was transferred to a siliconized glass tube. The organic phase was re-extracted with 1 ml methanol/1M NaCl (1:1, v/v) plus 50 µl 3N NaOH, and the aqueous fractions were combined. Mass measurement on SPP in the aqueous phase and total phospholipids in the organic phase were measured exactly as described in Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and Spiegel, S., J. Neurosci., 17, (1997) 6952-6960; Edsall, L. C., and Spiegel, S., Anal. Biochem., 272, (1999) 80-86).

Example 5: Northern Blotting Analysis

Poly(A)+ RNA blots containing 2 µg of poly(A)+ RNA per lane from multiple adult mouse and human tissues and mouse embryos were purchased from Clontech. Blots were hybridized with the 1.2 kb PSTI fragment of mouse EST AA389187 (mSPHK1 probe), the 1.5 kb EcoRI fragment of pCR3.1-mSPHK2, or the 0.3 kb PvuII fragment of pCR3.1-hSPHK1, after gel-purification and labeling with [α -³²P]dCTP. Hybridization in "ExpressHyb" buffer (Clontech) at 65°C overnight was carried out according to the manufacturer's protocol. Blots were reprobbed with b-actin as a loading control (Clontech). Bands were quantified using a Molecular Dynamics PhosphorImager.

Results

Cloning of Type 2 Sphingosine Kinase

Blast searches of the EST data base identified several ESTs that displayed significant homology to the recently cloned mSPHK1a sequence. Specific primers were designed from the sequences of these ESTs and were used to clone a new type of mouse and human sphingosine kinase (named mSPHK2 and hSPHK2) by the approaches of PCR cloning from a mouse brain cDNA library and 5'-RACE PCR.

ClustalW alignment of the amino acid sequences of mSPHK2 and hSPHK2 is shown in Fig. 1A. The open reading frames of mSPHK2 and hSPHK2 encode polypeptides of 617 and 618 amino acids, respectively, with 83% identity and 90% similarity. Five highly conserved regions (C1 to C5), identified previously in SPHK1s (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*, 273, (1998) 23722-23728), are also present in both type 2 kinases. Interestingly, the invariant GKGK positively charged motif in the C1 domain of SPHK1 is modified to GGRGL in SPHK2, suggesting that it may not be part of the ATP binding site as previously proposed (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*, 273,

(1998) 23722-23728). A motif search also revealed that a region beginning just before the conserved C1 domains of mSPHK2 and hSPHK2 (amino acid 147 to 284) also has homology to the diacylglycerol kinase catalytic site.

Compared to SPHK1, both SPHK2s encode much larger proteins containing 236 additional amino acids (Fig 1B). Moreover, their sequences diverge considerably from SPHK1 in the center and at the amino termini. However, after amino acid 140 of mSPHK2, the sequences of type 1 and type 2 SPHK have a large degree of similarity. These sequences (amino acid 9 to 226 for mSPHK1; 141 to 360 for mSPHK2), which encompass domains C1 to C4, have 47% identity and 79% similarity (Fig. 1B). In the C terminal portion of the proteins there are also large homologous regions, which include the C5 domain, from amino acid 227 to 381 for mSPHK1 and 480 to 617 for mSPHK2, with 43% identity and 78% similarity (Fig. 1B). The divergence in these domains suggests that SPHK2 probably did not arise as a simple gene duplication event.

Tissue Distribution of Sphingosine Kinase Type 2

The tissue distribution of SPHK2 mRNA expression in adult mouse was compared to that of SPHK1 by Northern blotting (Fig. 2A). In most tissues, including adult liver, heart, kidney, testis and brain, a predominant 3.1 kb SPHK2 mRNA species was detected, indicating ubiquitous expression. However, the level of expression was markedly variable and was highest in adult liver and heart and barely detectable in skeletal muscle and spleen (Fig. 2A). In contrast, the expression pattern of mSPHK1 was quite different, with the highest mRNA expression in adult lung, spleen, and liver, although expression in the liver did not predominate as with mSPHK2. mSPHK1 and mSPHK2 were both temporally and differentially expressed during embryonic development. mSPHK1 was expressed highly at mouse embryonic day 7 (E7) and decreased dramatically after E11 (Fig. 2B). In contrast, at

E7, mSPHK2 expression was much lower than mSPHK1, and gradually increased up to E17. The hSPHK2 2.8 kb mRNA transcript was mainly expressed in adult kidney, liver and brain, with much lower expression in other tissues (Fig. 2C). Interestingly, expression of SPHK2 in human kidney was very high and relatively much lower in the mouse, while the opposite pattern held for the liver.

Activity of Recombinant Sphingosine Kinase Type 2

To investigate whether mSPHK2 and hSPHK2 encodes bona fide SPHKs, HEK293 cells were transiently transfected with expression vectors containing the corresponding cDNAs. Because previous studies have indicated that SPHK might be present in cells in both soluble and membrane-associated forms (Olivera, A., and Spiegel, S., *Nature*, **365**, (1993) 557-560; Banno, Y., Kato, M., Hara, A., and Nozawa, Y., *Biochem. J.*, **335**, (1998) 301-304; Buehrer, B. M., and Bell, R. M., *J. Biol. Chem.*, **267**, 3154-3159; Olivera, A. Rosenthal, J., and Spiegel, S., *Anal. Biochem.*, **223**, (1994) 306-312; Ghosh, T. K., Bian, J., and Gill, D. L., *J. Biol. Chem.*, **269**, (1994), 22628-22635), recombinant SPHK2 activity was measured both in cytosol and in membrane fractions of transfected cells. As previously described in Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., *J. Biol. Chem.*, **273**, (1998) 23722-23728, untreated or vector transfected HEK 293 cells have low levels of SPHK activity (Fig. 3A). Twenty four hours after transfection with mSPHK2 and hSPHK2, *in vitro* SPHK activity was increased by 20 and 35 fold, respectively, and then decreased thereafter (Fig. 3A). In contrast, SPHK activity from cells transfected with mSPHK1 was much higher, 610-fold more than basal levels 24 hours after transfection and remaining at this level for at least 3 more days (data not shown). As in HEK293 cells, transfection of NIH 3T3 fibroblasts with mSPHK1 resulted in much higher SPHK activity than with mSPHK2. It was previously found that, similar to untransfected cells, the

majority of SPHK activity in cells transfected with mSPHK1 was cytosolic (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728). Similarly, in cells transfected with either mSPHK2 or hSPHK2, 17% and 26%, respectively, of the SPHK activity was membrane-associated (Fig. 3B), although Kyte-Doolittle hydropathy plots did not suggest the presence of hydrophobic membrane-spanning domains.

Transfection of HEK 293 cells with mSPHK2 and hSPHK2 also resulted in 2.2- and 3.3-fold increases in SPP, the product formed by SPHK, respectively (Fig. 3C), was in agreement with previous studies of sphingolipid metabolite levels after transfections with mSPHK1a showing a lack of correlation of fold increases in levels and in vitro enzyme activity (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728; Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava, V., Cu villier, O., Poulton, S., and Spiegel, S., J. Cell Biol., 147, (1999), 545-558).

Characteristics of Recombinant mSPHK2

Substrate specificity

Although SPHK2 is highly homologous to SPHK1, there are substantial sequence differences. Therefore, it was of interest to compare their enzymatic properties. Typical Michaelis-Menten kinetics were observed for recombinant SPHK2 (data not shown). The K_m for D-erythro-sphingosine as substrate is 3.4 μM , almost identical to the K_m previously found for SPHK1 (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 12576-12583). Although the naturally occurring D-erythro-sphingosine isomer was the best substrate for SPHK1 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728), D-erythro-dihydrosphingosine was a better substrate for SPHK2

52

than D-erythro-sphingosine (Fig. 4A). Moreover, although D,L-threo-dihydrosphingosine and phytosphingosine were not phosphorylated at all by SPHK1, they were significantly phosphorylated by SPHK2, albeit much less efficiently than sphingosine. Like SPHK1, other lipids including N,N-dimethylsphingosine (DMS), C2- or C16-ceramide, diacylglycerol, and phosphatidylinositol, were not phosphorylated by SPHK2 (Fig. 6A), suggesting high specificity for the sphingoid base.

DMS and DHS have previously been shown to be a potent competitive inhibitors of SPHK1 (Edsall, L. C., Van Brocklyn, J. R., Cuvillier, O., Kleuser, B., and Spiegel, S., Biochemistry, **37**, (1998), 12892-12898) and have been used to block increases in intracellular SPP levels resulting from various physiological stimuli (Olivera, A., and Spiegel, S., Nature, **365**, (1993), 557-560; Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coo, O. A., Gutkind, S., and Spiegel, S., Nature, **381**, (1996), 800-803; Edsall, L. C., Pirianov, G. G., and Spiegel, S., J. Neurosci, **17**, (1997), 6952-6960; Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., and van Koppen, C. J., EMBO J., **17**, 2830-2837; Choi, O. H., Kim, J.-H., and Kinet, J.-P., Nature, **380**, (1996), 634-636; Melendez, A., Floto, R. A., Gillooly, D. J., Harnett, M. M., and Allen, J. M., J. Biol. Chem., **273**, 9393-9402; Machwate, M., Rodan, S. B., Rodan, G. A., and Harada, S. I., Mol. Pharmacol., **54**, (1998), 70-77). However, because DHS is a substrate for SPHK2 and the product, dihydro SPP, is as potent as SPP in binding to and activating cell surface SPP EDG-1 family receptors, it cannot be used as a tool to investigate the role of SPHK2. Thus, it was important to characterize the inhibitory potential of the non-substrate DMS on SPHK2. Surprisingly, it was found that although DMS was also a potent inhibitor of SPHK2 (Fig. 4B), it acted in a non-competitive manner (Fig. 4C and Fig. 4D). The K_i for DMS with SPHK2 was 12

μM, slightly higher than the K_i of 4 μM with SPHK1, making it a useful tool to inhibit both types of SPHK.

mSPHK2 had highest activity in the neutral pH range from 6.5 to 8 with optimal activity at pH 7.5 (Fig. 5A), a pH dependency similar to that of SPHK1 (data not shown). The activity decreased markedly at pH values below and above this range.

Effects of KCl and NaCl

Most of the SPHK activity in human platelets is membrane-associated and extractable with 1 M NaCl (Banno, Y., Kato, M., Hara, A. and Nozawa, Y., *Biochem. J.*, 335, (1998), 301-304). Furthermore, the salt extractable SPHK from platelets has different properties than the cytosolic enzyme. It was thus of interest to determine the effect of high salt concentrations on recombinant SPHK1 and SPHK2. Interestingly, it was found that high ionic strength had completely opposite effects on their activities. SPHK1 was inhibited markedly inhibited by either NaCl and KCl with each causing 50% inhibition at a concentration of 200 mM (Fig. 5B). In contrast, SPHK2 activity was dramatically stimulated by increasing the salt concentration, with a maximal effect at a concentration of 400 mM, although KCl was much more effective than NaCl. However, above this concentration, SPHK2 activity decreased sharply although remaining elevated even at 1 M salt (Fig. 5C). Thus, the activities of SPHK1 and SPHK2 have completely opposite responses to changes in ionic strength. Kinetic analysis of mSPHK2 in the presence and absence of high concentrations of salt indicated that the K_m for sphingosine was unaltered but the V_{max} was increased (Fig. 5D and Fig. 5E). The physiological significance of these observations remains to be determined but it might be related to different subcellular localizations.

Substrate presentation

Because sphingolipids are highly lipophilic, in *in vitro* SPHK assays, sphingosine is usually presented in micellar form with Triton X-100 or as a complex with BSA (Olivera, A., Rosenthal, J., and Spiegel, S., J. Cell. Biochem., 60, (1996), 529-537; Olivera, A., Barlow, K. D., and Spiegel, S., Methods Enzymol., 311, (2000), 215-223). Furthermore, detergents such as Triton X-100 have been shown to stimulate the activity of SPHK in rat brain extracts (Buehrer, B. M., and Bell, R. M., J. Biol. Chem., 267, (1992), 3154-3159) and the enzyme from rat kidney (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 12576-12583), and it was previously found that the stability of rat kidney SPHK was increased in the presence of certain detergents (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 12576-12583). However, when the effect of increasing concentrations of Triton X-100 on the activities of SPHK1 and SPHK2 were compared, some unexpected results were found. Concentrations of detergent below 0.005% had no effect, but at higher concentrations, SPHK2 activity was inhibited and SPHK1 activity was markedly increased (Fig. 6A). At a concentration of Triton X-100 of 0.5%, SPHK1 activity was increased by more than 4 fold while SPHK2 was almost completely inhibited.

Interestingly, increasing the BSA concentration from the usual SPHK assay conditions with sphingosine-BSA complex as a substrate, i.e. 0.2 mg/ml BSA, caused a concentration-dependent inhibition of SPHK2 activity without affecting SPHK1 activity (Fig. 6B). Therefore, when measuring SPHK activity in cell or tissue extracts, the method of substrate preparation, whether in mixed micelles or in BSA complexes, must be carefully optimized because the differential effects of Triton X-100 and BSA on activity could yield different results depending on the relative expression of the two types of SPHK.

57

Effects of phospholipids

Acidic phospholipids, particularly phosphatidylserine, and phosphatidic acid and phosphatidylinositol, and cardiolipin to a lesser extent, induce a dose-dependent increase in SPHK activity Swiss 3T3 fibroblast lysates, whereas neutral phospholipids had no effect (Olivera, A., Rosenthal, J., and Spiegel, S., J. Cell. Biochem., 60, (1996), 529-537). In agreement, recombinant SPHK1 and SPHK2 were stimulated by phosphatidylserine; the activity of both was maximally increased 4-fold at a concentration of 40 µg/ml (Fig. 6C) and inhibited by higher concentrations in a dose-dependent manner. These effects of phosphatidylserine appeared to be specific since other phospholipids, including phosphatidylcholine, had no effect on the enzyme activity. In contrast, the activities of the three major forms of SPHK in human platelets are not affected by phosphatidylserine (Banno, Y., Kato, M., Hara, A., and Nozawa, Y., Biochem. J., 335, (1998), 301-304).

The mechanism by which phosphatidylserine enhances the enzymatic activity of SPHK is not yet understood. One possibility is that phosphatidylserine possesses unique membrane-structuring properties which better present the substrate, sphingosine. A second possibility is that SPHK contains determinants that specifically recognize the structure of the serine headgroup and that these determinants may only become exposed upon interaction of SPHK with membranes. In this regard, the molecular basis for the remarkable specificity of protein kinase C for phosphatidylserine has been the subject of much debate. However, recent data reveal that lipid structure and not membrane structure is the major determinant in the regulation of protein kinase C by phosphatidylserine (Johnson, J. E., Zimmerman, M. L., Daleke, D. L., and Newton, A. C., Biochemistry, 37, (1998), 12020-12025).

The presence of multiple ESTs in the database with significant homologies to SPHK1 as well as the identification

of several genes in *S. cerevisiae* encoding different SPHKs (Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L., and Dickson, R. C., J. Biol. Chem., 273, (1998), 19437-19442) suggests that there may be a large and important SPHK gene family. Although SPHK2 has a high degree of homology to SPHK1, especially in the previously identified conserved domains identified in type 1 SPHKs (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., and Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728), it is much larger (65.2 and 65.6 kDa for SPHK1 and SPHK2, respectively versus 42.4 kDa for mSPHK1a) and contains an additional 236 amino acids. Furthermore, its differential tissue expression, temporal developmental expression, cellular localization, and kinetic properties in response to increasing ionic strength and detergents, are completely different from SPHK1, suggesting that it most likely has a different function and regulates levels of SPP in a different manner than SPHK1 which is known to play a prominent role in regulating cell growth and survival. Thus, type 2 SPHK is considered to be involved in regulation of some of the numerous biological responses attributed to SPP, such as angiogenesis and allergic responses.

Sequence for GenBank 1 EMBC Bank Accession No.
bankit325787

1 aattogggcac gggggaggac cgaagtaaac gagggcttcca gaaccanaga gaagtcagcc
61 tgaagaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggcctttcc cgtccctgc tctaacctc
121 tccaggggta aagggacccg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgog
181 tggtagctct ctggccgcac gccgaccgct tctcggctgg ccggggaggc ccgggtgggc
241 tggtagctgg agctcccgaa gtatgtggaa tcaacgtctt tcaaaccttg gctggctct
301 gccattttaa gttgtgactt tggaggctgg tccaggagct gaccacagc caagagccta
361 ggaagtgcctt ggaatgaacc agggtoatgg ccccaacacc actactgcca gtggctgcca
421 gcactccaat cctgcacggc gaggtttggc cctaccggc caacggccca cggtttgccc
481 tcaacctcac aacacagcc ctacacatac agcgaatac ccaaaagcca gaagccgggc
541 ccgagatggg tctagtctct ctggatgagg tctcgggtgg tggcaccctg cagagccgta
601 ggcggaggga cactgcagcc tacttctgca tctaaccta cccagtgggc cgtogagggg
661 gcggggcag agctaogcgg accttcgggg cggatggggc caccacttat gaggagaato
721 gtgcagaggc ccagcgcctg gccactgccc tcaagtgtct cctccaggga gtgctctgt
781 caggggacca ggaatcacc cctgaattgc tgcccgga ggcaggctg ctcatattg
841 tcaatccctt tggggggcgg ggcctggcct ggcagcctg tatggacac gtggtgcca
901 tgatctctga agctgggctg tcttccaaac tcatcacagc agaacgacag aaccatgcc
961 gtgagctggg gcaggggta agcctgagtg agtgggaagg cattgtcact gtgtctggag
1021 acgggctgct ttacagggg ctgaatgggc tcttgatcg gccagactgg gaggatgccc
1081 tgggagtgcc cattggtgct ctccctgtg gatgggcaa tggctagct ggggcgggta
1141 gccatcatgg cgggtttgag caggctgctg gtgttgacct gttgctaac tggctgctt
1201 ttctctgocg tggtagcagc cttctctggt acttgctctc tgtgaogta gctcgggat
1261 cccgctggtt tctctctctg tcaaggcctt ggggattctt gtcagatgtg gacattcaca
1321 gtgagcgtct cagggccctg ggcagcgtc gattcacact gggtagctg ctaggcctgg
1381 cctcgttgca taactacgtt ggcagcctct cctacotccc cgtacacaa gaaccagcct
1441 tggccatccc aggcacagc ctgcctcagc ccaagtcaga actagtcttg gctccagccc
1501 cagcccccgc cgcacccac tgcctctac atcgtatctg gtctgacctg cccctgccc
1561 ttcccccagc tgccttggtc tccctgggtt cccctgagcc cctgcctgac ctgtccctca
1621 atggtggtgg tccagagctg actggagact ggggaggagc tggggatgca cctctgtccc
1681 cagaaccaat gctgcttca tccccaacg ctctcaaac agctcagctt taccctacg
1741 ctgaaggggc cccagaaatg ccagcatctt cggggttctt gctcccaac caccgtgccc
1801 cagaagcctc tactggggc ccagtggacc acctcctccc tccctggggc tctccactgc
1861 cccagactg ggtgacata gagggggagt ttgtactcat gttgggcatc ttgacgagcc
1921 acctctgccc agacctgatg gcagccccc atgcaagctt tgatgatggc gttgtgacc
1981 tgtgttgggt gcggagcggc atctacggg ctgacttct agcattttt ctggccatgg
2041 agcatggaa cacttcagc ctgggctgac cccctctggg ctatgctgca gcagtgctt

60

2101 tccgccttga accactcacg cctcgtggcc tgcctactgt agtatgggag ttagtggagt
 2161 atgggccaat acaggcgag gtgcacccag gtctcgccac gctgctcact gggcctgag
 2221 gtcaaaagcc acnagcctga acgagcctaa agcatggcg agttggtgga accagcgccc
 2281 cataggctaa gatctatcat ttacaggtag agtgggggcc cgcactcaga actgtgagga
 2341 ggggtggagag tggctcctgac cctcagttcc cagaggaact agaggtctga ggggtggggcc
 2401 tgcctttctt gatgtccaat gatggggcct ggaatgtatg agotagcag gcttcttcag
 2461 cttattgacc agccagggtt tcttcttgcc taotcgggtg cctctacttg actggccaat
 2521 cagcccttga ggggcagggt ccccgagggt gtcccagat ttgcactaat gtctctccc
 2581 tggccagtta gggatgggat gttctgtgtc ttgtgtgtcc ctctcctag tctaaaaagc
 2641 aattgaaag gtctatgcaa taagggtgtg tgcctccctc taaaaaaa aaaaaa

Sequence for Gen Bank 1 NMSC Bank Accession No.bankit325752

1 gccacatgg ccccgcccc accgcactg gctgcagca ccccgctct ccatgggag
 61 tttggctcct acccagcccg agggccacgc ttgcccctca ccttaacat gacggccctg
 121 cacatacagc ggtctgcccc caaacctgaa gccaggcccc ggggtggcct ggtccgcttg
 181 gccgaggtct caggctgctg caccctgaga agccgcagcc cctcagactc agcgccctac
 241 ttctgcatct acnccctacc tgggggcccc cgcggggccc ggcgagagga cactcgacc
 301 ttccgggcag atggggccgc caccctacga gagaacgctg ccgaggccca gcctggggcc
 361 actgcctca cctgtctgtc ccgaggactg ccactgcccc gggatgggga gatcaacct
 421 gacctgctac ctccggccgc ccggttgcct ctattggtca atccctttgg gggctggggc
 481 ctggcctggc agtgggtgaa gaaccagctg ctcccatga tctctgagc tgggctgtcc
 541 ttcaacctca tccagacaga acgacagaa caogccggg agctggctca ggggtgagc
 601 ctgagtgagt gggatggcat cgtcacggctc tgggagagc ggtctctcca tgaggctgtg
 661 aacgggctcc tagatcgccc tgcctgggag gaagctgtga agatgctgt gggcatctc
 721 ccctgcggct cgggcacgc gctggccgga gcagtgaaac agcaaggggg atttgagca
 781 gccctgggcc tgcacctgtt gctcaactgc tcactgttgc tgtgcggggg tgggtggcac
 841 ccactggacc tgotctcgt gaogctggcc tgggctccc gctgtttctc ctctctgtc
 901 gtggcctggg gcttctgtc agatgtggat atccagagcg agccttctag ggccttggg
 961 agtgcccgct tcaactggg caogtgtgt ggcctcgca cactgcacac ctacgggga
 1021 cgcctctctt acctcccgcc cactgtggaa cctgctcgc ccacccctgc ccatagcctg
 1081 cctcgtgcca agtcggagct gaccctaacc ccagacccag ccccgccat ggcacactc
 1141 cccctgcctc gttctgtgtc tgacctgct ctccctgc ccagcctgc cctggcctc
 1201 cctggctcgc cagaaacct ggcctcctg tccctcaag gtggggggcc agagctggct
 1261 ggggaactgg gtggggctgg ggaatgctcc ctgtcccgcc accaatgct gtcttcaact
 1321 cctggctctc ccaggcagc tctacactca ccgtctccg aaggggcccc cgtaatctc
 1381 ccatcctctg ggtcccaact tccacccct gatgcgggg taggggcctc cgaactgggg
 1441 cgcgccgacc acctgtgctc tccgtgggg accccgctgc cccagactg gtgacgtg
 1501 gggggggact ttgtgtcat gttggcctc tggccagcc acctagggc tgacctgggtg
 1561 gcagctcgc atgcggctt cgaagacggc ctggtgcaac tgtgtgggt gcgtagcggc

61

1621 atctcggggg ctgogctgct ggcctcttct ttggccatgg agcgtggtag ccacttcago
 1681 ctgggctgtc cgcagctggg ctacgcggcg gccogtgcct tcogcctaga gccgtcaca
 1741 ccacggggcg tgctcacagt ggaaggggag caggtggagt atggggcggt acagggcag
 1801 atgcaccctg gcatcggtac actgctcact gggcctcctg gctgcccggg gggggagccc
 1861 tgaactaa caagcttggt accgcggggg ggcggggcct acattccat gggggggagc
 1921 ttgagotagg ggtgtggcc tggctgctag agttgtggtg gcagggggcc tggcccgto
 1981 tcaggattgc gctcgcttct atggggacag acgtgatgct ggaaggtggg cgtcgtoacg
 2041 gttamagaga aatgggctcg tcccgagggt agtgctgat caatgagggc ggggcttggc
 2101 gtctgatctg gggcgccct tacggggcag ggtcagtc tgacgcttgc cactgctcc
 2161 taccgggcca ggtggctga gggcgagtc tattttacgc gtcggccat gacaggacct
 2221 ggaatgtact ggtgggta ggcctcagtg agtcggcgg tcagggccg cagcttcgca
 2281 ccattccctc cgtgctctc atttagctg caatcagcc caggaggggc aggttcocog
 2341 gggcgggcgc taggatttgc actaatgttc ctctcccg

SEQ ID NO. 14

Amino acid sequences of human SPHK2

MAPPPFLAASTFLLEGFGSYFANGFRFALTLTLSQALHIQRLKPKPEARFPGSLVPLAEVSGCCTLRER
 SPEDSAAYFCITYTYFRGGGRRATRTFRADGAATYENRAEAGRWATALTCLLGLVPLSGDQETTPDL
 LFRFPRLILLVNPFGGRGLANQRCNHLVPMISEAGLSFHLIQTERQNEARLVQGLSLSEWDSIVTVSG
 DGLLYEVLNGLLDRPDWEAVNMPVGLPCGSGALAGAVRNGGFPFALGLDLLNCSILLCRGGHPL
 DLLSVTLASGSRCSFSLSVANGFVSDVDIQSERFRALGARFTLGTVLGLATLETYRGLSYLPATVEPA
 SFTPAEHLFRAKSELTLTPDFAPFMAHSPILRSVSDLVFLPQPALASPGSPFPLFSLNGGGFELAGD
 WGGAGDAPLSFDPLSPFSGSPKALHSPVSEGAFFVFPSSGLPLFTDARVGAATCOFPDHLPLPLTP
 LPQDWVTLGGDFVLMGLTSPHLGADLVAAFHAFDDGLVLCWVRSGLSRAALLRIPLANESNEHSLG
 CPQLGYAARAFLKPLTFRGLTVDGEVSYGFLQAQNEFGIGTLLTGVPFGCPGHEP

SEQ ID NO. 12

Amino Acid Sequence of mouse SPHK2

MAPPFLFVAASTFLLEGFGSYFANGFRFALTLTQALHIQRLKPKPEARFPGSLVSLDEVSGCCTLQS
 RSPEDTAAYFCITYTYFRGGGRRATRTFRADGATTYENRAEAGRWATALTCLLGLVPLSGDQETTPR
 LFRFPRLILLVNPFGGRGLANQRCNHLVPMISEAGLSFHLIQTERQNEARLVQGLSLSEWDSIVTVS
 GGLLYEVLNGLLDRPDWEAVNMPVGLPCGSGALAGAVRNGGFPVVGVDLLNCSILLCRGGHPL
 DLLSVTLASGSRCSFSLSVANGFVSDVDINSEFRALGARFTLGAVLGLASLETYRGLSYLPATTEP
 ALPIGHSPLFAKSELVLAPAPAPATSEFLHRSVSDLVFLPQPALVSPGSPFPLFSLNGGGFELTG
 DWGGAGDAPLSFDPLSPFSPALTAQLSPFAQFPFGASSGFLPFTSAPEASTWGFVDHLPLPLSP
 LPQDWVTLGGDFVLMGLTSHLCADLVAAFHAFDDGVVLCWVRSGLSRAALLRIPLANESNEHSLG
 CPHLGYAARAFLKPLTFRGLTVDGEVSYGFIQAQNEFGLATLLTGPAQKPKQA

SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED
GEORGETOWN UNIVERSITY

<120> Human Sphingosine Kinase Type 2 Isoform, Cloning,
Expression and Methods of Use Thereof

<130> 00170PCT/HK

<140>

<141>

<150> US 80/184,318

<151> 2000-04-03

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Hs. musculus

<400> 1

aatgattgaa aatgattgaa tatttg

28

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Hs. musculus

<400> 2

aaagtatttg aaagtatttg agaa

24

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 3
 agctagagga ttctgg 18

<210> 4
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' RAGE
 Abridged Anchor Primer

<220>
 <221> modified_base
 <222> (24).. (25)
 <223> !

<220>
 <221> modified_base
 <222> (28).. (30)
 <223> !

<220>
 <221> modified_base
 <222> (34).. (35)
 <223> !

<400> 4
 ggcacagagt agctagtag ggcagagggg ggcagg 38

<210> 5

64

<11> 22

<12> DNA

<13> Mus musculus

<400> 5

gagtagtg agagtggg tg

22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Description of Artificial Sequence: Abridged
Universal Amplification Primer

<400> 8

ggagaggt agatagta

20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

agtataagt agatagga aa

22

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ccaactaat caggt

18

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gagggcagc cagctttag ag

22

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 attgacact agagagacac

20

<210> 11
 <211> 2698
 <212> DNA
 <213> Bos musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (387).. (2237)

<300>
 <302> Molecular cloning and functional characterization of a
 novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform
 <303> J. Biol. Chem.
 <304> 275
 ... <305> 26 ..
 <306> 18513-18520
 <308> AF245448

<400> 11

aattaggaas gaggaggaas agatgaasas gaggattaca gacaaaga gaagtaaga 80
 tgaaggaag gtaggaas gtaggata tgaatttao agtaactga tatatacta 120
 taagagga agaggaag agatgaag aatgaag agttgata agatgaag 180
 tttgactat aggaagaa gaagaaagt tatagtaga tagagga aggttaga 240
 tttgtagg agatgaas gtagtaga taagattat taagattg gaagtagat 300
 gaatttaa gttgattat tagagtaga taagattat gaaggaag aggttaga 360
 gaagtagg agatgaas aggtat atg gaa aca aca aca ata atg aca atg 413
 Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val
 1 5

gat gaa aga aat aca ata atg aca gaa gag ttt ggt taa taa aag gaa 481
 Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala
 10 15 20 25

aat gaa aca agt ttt gaa ata aca ata aca aca aca aca aca ata 509
 Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr Leu Thr Thr Glu Ala Leu His Ile
 30 35 40

aag aca ata agt aca aag aca gaa gaa agt aca aca ggt ggt ata ata 557
 Glu Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val
 45 50 55

tat atg gat gag ata tag gaa ttt gaa aca atg aag aga agt aga aca 605
 Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly Cys Gly Thr Leu Glu Ser Arg Ser Pro
 60 65 70

gag gaa aat gaa gaa taa tta tta ata taa aca taa aca agt gaa agt 653
 Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg
 75 80 85

aca gaa gaa agt aga aca gat aag agt aca tta agt gag ggt gaa gaa 701
 Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala

62

80	85	100	105
acc act tat gag gag act cgt gaa gag gaa cag cga tgg gaa act gaa 749			
Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala Glu Ala Glu Arg Trp Ala Thr Ala			
110	115	120	
etc cag tgt etc etc aga gga gtg act etc taa ggg gaa cag gaa ata 787			
Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Val Pro Leu Ser Gly Asp Glu Glu Ile			
125	130	135	
acc act gaa ttg etc acc aga cag acc aga etc etc etc ttg gtc act 845			
Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn			
140	145	150	
acc ttt ggg ggg ggg gga etc gaa tgg cag cga tgt etc gaa caa gtg 883			
Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala Trp Glu Arg Cys Met Asp His Val			
155	160	165	
gtg cca etc etc tat gaa gct ggg etc taa tta acc etc etc cag acc 841			
Val Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Glu Thr			
170	175	180	185
gaa aga cag acc act gaa cgt gag etc gtg cag ggg tta aga etc agt 888			
Glu Arg Glu Asn His Ala Arg Glu Leu Val Glu Gly Leu Ser Leu Ser			
190	195	200	
gag tgg gaa ggc att gta act gtg tat gga gaa ggg etc att taa gag 1037			
Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu			
205	210	215	
gtg etc act ggg etc att gct ggg cca gaa tgg gag gct gaa gtg cgg 1085			
Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg			
220	225	230	
atg acc att ggt gta etc acc tgt gga tag gga act gag etc gct ggg 1133			
Met Pro Ile Gly Val Leu Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly			
235	240	245	

gag gta aga oot oit aga gga ttt gag oag gtt gta ggt gtt gaa etg 1181
Ala Val Ser His His Gly Gly Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu
250 255 260 265

ttg ata aas tga tag att att ata tga agt ggt gga aga oot oot etg 1229
Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Phe Leu
270 275 280

gaa ttg ata tat gta aag ata gaa tag gga taa aga tgt ttt taa tta 1277
Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe
285 290 295

etg taa gta gaa tag aga tta ttg taa gat gta gaa att caa agt gag 1325
Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu
300 305 310

aga tta agg gaa etg gga aga gat aga tta caa etg ggt gaa gta eta 1373
Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu
315 320 325

gga etg gaa tag ttg aat aaa taa agt gga aga ata taa taa ata aaa 1421
Gly Leu Ala Ser Leu His Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro
330 335 340 345

gat aac aca gaa caa gaa ttg aca ata caa gga caa agt etg oot aga 1469
Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg
350 355 360

gaa aag taa gaa ata gta ttg gat caa gaa caa gaa caa gaa gaa aca 1517
Ala Lys Ser Gly Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr
365 370 375

aac tag oot ata oot aga tat gta tat gaa etg aca etg aca att aca 1565
His Ser Pro Leu His Arg Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro
380 385 390

eag oot gaa ttg gta taa oot gga taa oot gag aca etg oot gaa etg 1813
Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu

385	400	405	
tea eta ent gxt gxt gxt oca gag etg ect gze.gac tgz gze gze got			1681
Ser Lau Aan Gly Gly Gly Pro Glu Lau Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala			
410	415	420	425
gze gxt gze ent etg tee oca gae oca etg etg ect tee tee oca oca			1708
Gly Asp Ala Pro Lau Ser Pro Asp Pro Lau Lau Pro Ser Ser Pro Aan			
430	435	440	
gxt eta aae aae gxt oag ett tee oca eta gxt gae gze oca oca gae			1757
Ala Lau Lys Thr Ala Glu Lau Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu			
445	450	455	
etg oca gae tot tgz gze tte etg ect oca aae aae agt gae oca gae			1805
Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe Lau Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu			
460	465	470	
gae tot aae tgz gze oca gte gae oca eta eta ect aae etg gze tot			1853
Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val Asp His Lau Lau Pro Pro Lau Gly Ser			
475	480	485	
oaa etg oaa oaa gae tgz gte oca eta gag gze gag ttt gte eta etg			1901
Pro Lau Pro Glu Asp Trp Val Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Lau Met			
490	495	500	505
ttg gze eta ttg agt gze oca eta tpe gae gae etg etg gae gae oca			1949
Lau Gly Ile Lau Thr Ser His Lau Gys Ala Asp Lau Met Ala Ala Pro			
510	515	520	
ect gae ego ttt gxt gxt gze gtt gte oca etg tzt tgz gte gze gze			1997
His Ala Arg Phe Asp Asp Gly Val Val His Lau Gys Trp Val Arg Ser			
525	530	535	
gze eta tee gze gxt gae ett eta ego att ttt etg gae etg gag ect			2045
Gly Ile Ser Arg Ala Ala Lau Lau Arg Ile Phe Lau Ala Met Glu His			
540	545	550	

70

gga aac aac tta agc atg gga tga ccc aat atg gga tat ggt gaa gaa 2083
Gly Asn His Phe Ser Leu Gly Gys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala
535 580 585

agt gac tta aga att gaa aca ata aag aat agt gga atg ata aat gta 2141
Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val
570 575 580 585

ggt gga gag tta atg gag tat gga aca ata aag gag aag atg aac aca 2188
Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr Gly Pro Ile Glu Ala Glu Val His Pro
580 585 600

ggt ata gaa aag atg ata aat gga aat gaa ggt aac aag aca aca gaa 2237
Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr Gly Pro Ala Gly Glu Lys Pro Glu Ala
605 610 615

tgacagagac taacagatg ggaatggt ggaacagac acaatagga taagtatat 2287

atttaacag tagaatgga gaaagacata agaatgga ggaatgga gattatatt 2357

gaactcagt taacagaga atagaggt agaatgga gaaatgga attatgaa 2417

aatgagga atagatgt atagatga aagattatt aagattatt aagagagga 2477

gtttattatt gaaatag atgactata ttgatgaa acaagacat tgatgagga 2537

gttaacag gttgacaa gttgacat atgttata atagagga ttatgagga 2587

gatttatgt gttatggt taactata tagtatata agaatgga aagttatat 2657

caataaggt tttgattac atataaaaa aaaaaaaa a 2698

- <210> 12
- <211> 817
- <212> PRT
- <213> Hum musculus

<403> 12

Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu
1 5 10 15

His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu
20 25 30

Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro
35 40 45

Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly
50 55 60

Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe
65 70 75 80

Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala
85 90 95

Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg
100 105 110

Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly
115 120 125

Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg
130 135 140

Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu
145 150 155 160

Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val Val Pro Met Ile Ser Glu Ala
165 170 175

Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg
180 185 190

Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr

185	200	205
Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp		
210	215	220
Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg Met Pro Ile Gly Val Leu Pro		
225	230	235 240
Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Ser His His Gly Gly		
245	250	255
Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu Leu Leu Asn Gys Ser Leu Leu		
260	265	270
Leu Gys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu		
275	280	285
Ala Ser Gly Ser Arg Gys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe		
290	295	300
Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser		
305	310	315 320
Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu Gly Leu Ala Ser Leu His Thr		
325	330	335
Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu		
340	345	350
Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu		
355	360	365
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr His Ser Pro Leu His Arg Ser		
370	375	380
Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro		
385	390	395 400

Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro
405 410 415

Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro
420 425 430

Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu
435 440 445

Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe
450 455 460

Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val
465 470 475 480

Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val
485 490 495

Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met Leu Gly Ile Leu Thr Ser His
500 505 510

Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
515 520 525

Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
530 535 540

Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His Gly Asn His Phe Ser Leu Gly
545 550 555 560

Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
565 570 575

Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr
580 585 590

Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr
595 600 605

74

Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
610 615

<210> 13
<211> 2380
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1860)

<300>
<302> Molecular cloning and functional characterization of a
novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform
<303> J. Biol. Chem.
<304> 275
<305> 28
<306> 18513-18520
<308> AF245447

<400> 13
gagaaa atg gcc aag aca aca aag aca atg ggt gcc aga aca aag atc 48
Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu
1 5 10

atc cat ggc gag ttt ggc tac tac aca gcc aga ggc aca aga ttt gcc 88
Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala
15 20 25 30

atc acc ctt aca tag cag gcc atg aac ata aag agc atg agc aca aca 144
Leu Thr Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys
35 40 45

cct gaa gcc agc aca agc ggt gcc atg gtc aag ttg gcc gag gtc taa 182
Pro Glu Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser

25

80	55	60	
gga tga tga aca atg aga aga aga aga aca taa gaa taa gag gaa taa			240
Gly Gys Gys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr			
65	70	75	
tta tga ata taa aca taa aat aga aga aga aga gag gaa aga aga aga			288
Phe Gys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg			
80	85	90	
gaa aat aga aca tta gag gaa gat gag gaa gaa aca taa gaa gag aca			336
Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn			
95	100	105	110
agt gaa gag gaa cag aga tag gaa aat gaa ata aca tgt atg ata aga			384
Arg Ala Glu Ala Glu Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Gys Leu Leu Arg			
115	120	125	
gga atg aca atg aca gag gat gag gag ata aca aat gaa atg ata aat			432
Gly Leu Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro			
130	135	140	
agg aag aca agg ttg att ata ttg gta aat aca ttt gag gat agg gaa			480
Arg Pro Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly			
145	150	155	
atg gaa tag aag tag tat aag aca aca gtg att aca atg ata tat gaa			528
Leu Ala Trp Glu Trp Gys Lys Asn His Val Leu Pro Ser Ile Ser Glu			
160	165	170	
gat gag atg taa tta aca ata ata aag aca gaa aga cag aca aca gaa			576
Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Glu Thr Glu Arg Glu Asn His Ala			
175	180	185	190
agg gag atg gta cag gag atg aga atg agt gag tag gat gaa ata gta			624
Arg Glu Leu Val Glu Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val			
195	200	205	

aag gto tag gga gao ggg etg eto opt gag gtg etg aac ggg eto eto 672
 Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu
 210 215 220

gat aga aat gao tag gag gao gat gtg aag etg aat gtg gga eto eto 720
 Asp Arg Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu
 225 230 235

cca tga gga tag gga aac gag etg gcc gga gao gtg aac aag aac ggg 768
 Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly
 240 245 250

gga ttt gag aca gao etg gga eto gao etg ttg eto aac tga toa etg 816
 Gly Phe Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu
 255 260 265 270

ttg etg tga gag ggt gat gga aac aca etg gao etg eto too gtg aag 864
 Leu Leu Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr
 275 280 285

etg gao tag gga toa aga tgt tta toa tta etg tat gtg gao tag gga 912
 Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly
 290 295 300

tta gtg toa gat gtg gat eto aag aga gag aga tta agg gao ttg gga 960
 Phe Val Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly
 305 310 315

agt gao aga tta aac etg gga aag gtg etg gga eto gao aac etg aac 1008
 Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His
 320 325 330

aac taa aga gga aga eto too toa eto aac gao aat gtg gao aat gao 1056
 Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala
 335 340 345 350

tag aac aac aat gao aat aga etg aat agt gao aag tog gag etg aac 1104
 Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr

355	360	365	
ota aca aca gao aca gao aag aca atg gao aca too aca atg aat aat 1152 Lou Thr Pro Asp Pro Ala Pro Pro Not Ala His Ser Pro Lou His Arg			
370	375	380	
tat gtg tat gao atg aat att aca atg aca aag aat gao atg gao tat 1200 Ser Val Ser Asp Lou Pro Lou Pro Lou Pro Gin Pro Ala Lou Ala Ser			
385	390	395	
aat gao tag aca gao aca atg aca aca atg too aca aca aat gao gao 1248 Pro Gly Ser Pro Glu Pro Lou Pro Ile Lou Ser Lou Aaa Gly Gly Gly			
400	405	410	
aca gao atg gat gao gao tag gat gao gat gao gat gat aag atg too 1296 Pro Gly Lou Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Lou Ser			
415	420	425	430
aag gao aca atg atg tat too aat aat gao tat aca aag gao gat aca 1344 Pro Asp Pro Lou Lou Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Lou			
435	440	445	
aca too aca gta too gao gao gao gao gta att aca aca too tat gao 1392 His Ser Pro Val Ser Gly Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly			
450	455	460	
ata aca att aca aca aat gat gao aag gta gao gao too aca tgc gao 1440 Lou Pro Lou Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly			
465	470	475	
aag aca gao aca atg atg aat aag atg gao aca aag atg aca aca gao 1488 Pro Pro Asp His Lou Lou Pro Pro Lou Gly Thr Pro Lou Pro Pro Asp			
480	485	490	
tgc atg aag atg gao gao gao gao ttt gta aca atg ttg gao aca too aca 1536 Trp Val Thr Lou Gly Gly Asp Phe Val Lou Met Lou Ala Ile Ser Pro			
495	500	505	510

ago aas eta gga got gao etg gte gaa got aag out gag aga tto gao 1584
 Ser His Lau Gly Ala Asp Lau Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp
 515 520 525

gao gga etg gte aas etg tga tag gte agt aga gga sta tag agt got 1632
 Asp Gly Lau Val His Lau Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala
 530 535 540

gag etg etg ago ett tto ttg gaa etg gag agt ggt aga aas tto ago 1680
 Ala Lau Leu Arg Leu Phe Lau Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser
 545 550 555

etg gga tgt aag aag etg gga taa gaa gag gaa agt gag tto aag eta 1728
 Lau Gly Cys Pro Glu Lau Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu
 560 565 570

gag aag etg aas aas ago gga gte etg aas gte gaa gga gag aag gte 1776
 Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Glu Val
 575 580 585 590

gag tat gag aag eta aag gaa aag etg aas aat gga eta ggt aas etg 1824
 Glu Tyr Gly Pro Leu Glu Ala Glu Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu
 595 600 605

eto aat gag aat aat gga tga aag gag gag gag aas tgaactaaa 1870
 Leu Thr Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
 610 615

aaagtattgt aaagccagg ggaaggagat aatttaaat ggaagagga ttgagatagg 1930

aaatggaaa ttgtgtatg agtattgtg gaagaaaaa tgaacagta taaggattga 1980

gtatgtttt atggaacag aattgttgt ggaagtggg ctatgtcag gttaagaga 2030

aattggcttg taacagaggt agtgactgt caatggagg gaggatggg gtatgtatg 2110

gagagccat taaggagag ggaatgtca tgaatttga caatgtaca taacagaaa 2170

77

agrtgptga agagagga tattttaaga gtagaast gaaggaast gaagtat 2230

agrtgptga agatagtg agtaggag tagggagc agatagag aatagata 2290

agrtgptga attagatg aatagagc agtaggag agttagag agtaggag 2350

taggtttga aatagttg atagagga 2380

<210> 14

<211> 818

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Het Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu Leu His
1 5 10 15

Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr
20 25 30

Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu
35 40 45

Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Gly Val Ser Gly Gys
50 55 60

Gys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr Phe Gys
65 70 75 80

Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg Ala Thr
85 90 95

Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala
100 105 110

Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Gys Leu Leu Arg Gly Leu
115 120 125

Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro Arg Pro
130 135 140

Pro Arg Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala
145 150 155 160

Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly
165 170 175

Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu
180 185 190

Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val Thr Val
195 200 205

Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg
210 215 220

Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu Pro Cys
225 230 235 240

Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly Gly Phe
245 250 255

Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu
260 265 270

Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala
275 280 285

Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Val
290 295 300

Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala
305 310 315 320

Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr

325	330	335
Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala Ser Pro		
340	345	350
Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr Leu Thr		
355	360	365
Pro Asp Pro Ala Pro Pro Ser Ala His Ser Pro Leu His Arg Ser Val		
370	375	380
Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Glu Pro Ala Leu Ala Ser Pro Gly		
385	390	395
Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu		
405	410	415
Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp		
420	425	430
Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu His Ser		
435	440	445
Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro		
450	455	460
Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Gys Gly Pro Pro		
465	470	475
Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp Trp Val		
485	490	495
Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Ser Leu Ala Ile Ser Pro Ser His		
500	505	510
Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly		
515	520	525

Leu Val His Leu Gys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
530 535 540

Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser Leu Gly
545 550 555 560

Gys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
565 570 575

Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val Glu Tyr
580 585 590

Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu Leu Thr
595 600 605

Gly Pro Pro Gly Gys Pro Gly Arg Glu Pro
610 615

<210> 15

<211> 388

<212> PRT

<213> Mus musculus

<300>

<302> Molecular cloning and functional characterization of
murine sphingosine kinase

<303> J. Biol. Chem.

<304> 273

<305> 37

<306> 23722-23728

<307> AAC81688

<400> 15

Met Trp Trp Gys Gys Val Leu Phe Val Val Glu Gys Pro Arg Gly Leu
1 5 10 15

Leu Pro Arg Pro Gys Arg Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Gln Gly Gly

20	25	30
Lys Gly Lys Ala Leu Gln Leu Phe Gln Ser Arg Val Gln Pro Phe Leu		
35	40	45
Glu Glu Ala Glu Ile Thr Phe Lys Leu Ile Leu Thr Glu Arg Lys Asn		
50	55	60
His Ala Arg Glu Leu Val Cys Ala Glu Glu Leu Gly His Trp Asp Ala		
65	70	75
Leu Ala Val Met Ser Gly Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly		
85	90	95
Leu Met Glu Arg Pro Asp Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu Cys		
100	105	110
Ser Leu Pro Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Val Asn His		
115	120	125
Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu Ile Asn Cys		
130	135	140
Thr Leu Leu Leu Cys Arg Arg Arg Leu Ser Pro Met Asn Leu Leu Ser		
145	150	155
Leu His Thr Ala Ser Gly Leu Arg Leu Tyr Ser Val Leu Ser Leu Ser		
165	170	175
Trp Gly Phe Val Ala Asp Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Tyr Arg Arg		
180	185	190
Leu Gly Glu Ile Arg Phe Thr Val Gly Thr Phe Phe Arg Leu Ala Ser		
195	200	205
Leu Arg Ile Tyr Gln Gly Gln Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Thr Val		
210	215	220

Ala Ser Lys Arg Pro Ala Ser Thr Leu Val Gln Lys Gly Pro Val Asp
225 230 235 240

Thr His Leu Val Pro Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val
245 250 255

Val Pro Glu Gln Asp Phe Val Leu Val Leu Val Leu Leu His Thr His
260 265 270

Leu Ser Ser Glu Leu Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Glu Ala Gly
275 280 285

Val Met His Leu Phe Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Ala Leu
290 295 300

Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Gln Lys Gly Lys His Met Glu Leu Asp
305 310 315 320

Cys Pro Tyr Leu Val His Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu Pro
325 330 335

Arg Ser Gln Arg Gly Val Phe Ser Val Asp Gly Glu Leu Met Val Cys
340 345 350

Glu Ala Val Gln Gly Gln Val His Pro Asn Tyr Leu Trp Met Val Cys
355 360 365

Gly Ser Arg Asp Ala Pro Ser Gly Arg Asp Ser Arg Arg Gly Pro Pro
370 375 380

Pro Glu Glu Pro
385

It will be appreciated that the instant specification is set forth by way of illustration and not limitation, and that various modifications and changes may be made without departing from the spirit and scope of the present invention.

Applicant's original file reference	00170PCT/HG	International application No. PCT/US 01/09664
--	-------------	---

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 136b)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>18</u> , lines <u>27 to 33</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depository institution National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology	
Address of depository institution (including postal code and country) 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566	
Date of deposit March 29, 2000	Accession Number FERM BP-7110
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is contained on an additional sheet ☐	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer S. R. Hostad	Authorized officer

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated and purified DNA which encodes a mammalian sphingosine kinase type 2 isoform.
2. The isolated and purified DNA of claim 1, which encodes a mouse sphingosine kinase type 2 isoform DNA.
3. The isolated and purified DNA of claim 1, which encodes a human sphingosine kinase type 2 isoform DNA.
4. The isolated and purified DNA of claim 2, which encodes a peptide of 617 amino acids.
5. The isolated and purified DNA of claim 3, which encodes a peptide of 618 amino acids.
6. A peptide encoded by the DNA of claim 4.
7. A peptide encoded by the DNA of claim 5.
8. An amino acid sequence of human SPHK2 consisting essentially of SEQ ID NO: 14.
9. An amino acid sequence of murine SPHK2 consisting essentially of SEQ ID NO: 12.
10. An isolated and purified DNA which encodes a peptide of a sphingosine kinase type 2 isoform, said DNA comprising a sequence selected from the group consisting of the sequence of Genbank Accession No. nkit325787 and the sequence of Genbank Accession No. bankit325752.
11. A recombinant DNA construct comprising:
 - (a) a vector and
 - (b) the DNA of claim 2.

12. A recombinant DNA construct comprising:
(a) a vector and
(b) the DNA of claim 3.

13. The recombinant DNA construct according to claim 11, wherein said vector is an expression vector.

14. The recombinant DNA construct according to claim 11, wherein said vector is a prokaryotic vector.

15. The recombinant DNA construct according to claim 11, wherein said vector is a eukaryotic vector.

16. The recombinant DNA construct according to claim 12, wherein said vector is an expression vector.

17. The recombinant DNA construct according to claim 12, wherein said vector is a prokaryotic vector.

18. The recombinant DNA construct according to claim 12, wherein said vector is a eukaryotic vector.

19. A host cell transformed with the recombinant DNA construct according to claim 11.

20. The host cell according to claim 19, wherein said cell is prokaryotic.

21. The host cell according to claim 19, wherein said cell is eukaryotic.

22. A host cell transformed with the recombinant DNA construct according to claim 12.

23. The host cell according to claim 22, wherein said cell is prokaryotic.

24. The host cell according to claim 22, wherein said cell is eukaryotic.

25. A method for producing a mouse sphingosine kinase type 2 isoform peptide which comprises culturing the host cell according to claim 19, under conditions such that an isolated mouse sphingosine kinase type 2 isoform DNA is expressed and said mouse sphingosine kinase type 2 isoform peptide is thereby produced.

26. A method for producing a human sphingosine kinase type 2 isoform peptide which comprises culturing the host cell according to claim 22, under conditions such that an isolated human sphingosine kinase type 2 isoform DNA is expressed and said human sphingosine kinase type 2 isoform peptide is thereby produced.

27. A method for detecting an agent or a drug which inhibits or promotes sphingosine kinase type 2 activity comprising:

- (a) providing a recombinant DNA construct according to claim 11, into a cell such that sphingosine kinase type 2 isoform is produced in said cell;
- (b) adding at least one drug or agent to said cell, and
- (c) detecting whether or not said drug or agent inhibits or promotes sphingosine kinase type 2 activity by measuring sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids in said cells and comparing the resultant measurement to a control which did not receive said drug or agent, wherein a decrease in the amount of sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids as compared to the control indicates an inhibitory drug or agent, or an increase in the amount of sphingosine

90

kinase-dependent phosphorylation of lipids in said cell as compared to the control indicates a stimulatory drug or agent.

28. A method for detecting an agent or a drug which inhibits or promotes sphingosine kinase type 2 activity comprising:

- (a) providing a recombinant DNA construct according to claim 12, into a cell such that sphingosine kinase type 2 isoform is produced in said cell;
- (b) adding at least one drug or agent to said cell, and
- (c) detecting whether or not said drug or agent inhibits or promotes sphingosine kinase type 2 activity by measuring sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids in said cells and comparing the resultant measurement to a control which did not receive said drug or agent, wherein a decrease in the amount of sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids as compared to the control indicates an inhibitory drug or agent, or an increase in the amount of sphingosine kinase-dependent phosphorylation of lipids in said cell as compared to the control indicates a stimulatory drug or agent.

29. An agent or drug detected by the method of claim 27.

30. An agent or drug detected by the method of claim 28.

31. A method of regulating a biological process in a mammal comprising administering to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of the peptide according to claim 6.

32. A method of regulating a biological process in a mammal comprising administering to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of the peptide according to claim 7.

33. The method of claim 31, wherein the biological process is selected from the group consisting of mitogenesis, apoptosis, neuronal development, chemotaxis, angiogenesis and inflammatory responses.

34. The method of claim 31, wherein the biological process is angiogenesis.

35. The method of claim 32, wherein the biological process is selected from the group consisting of mitogenesis, apoptosis, neuronal development, chemotaxis, angiogenesis and inflammatory responses.

36. The method of claim 32, wherein the biological process is angiogenesis.

37. A method for the treatment or amelioration of a disease resulting from increased cell death or decreased cell proliferation, comprising administering to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of a peptide according to claim 6.

38. A method for the treatment or amelioration of a disease resulting from increased cell death or decreased cell proliferation, comprising administering to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of a peptide according to claim 7.

39. A method for the treatment or administration of a disease resulting from decreased cell death or increased cell proliferation comprising administering to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of an antibody to a peptide according to claim 6.

40. A method for the treatment or administration of a disease resulting from decreased cell death or increased cell proliferation comprising administering to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of an antibody to a peptide according to claim 7.

41. A method for the treatment or amelioration of a disease resulting from abnormal migration or motility of cells selected from the group consisting of cancer, restenosis and diabetic neuropathy, the method comprising administering to a mammal in need thereof, a pharmaceutically effective amount of an antibody to a peptide according to claim 6.

42. A method for the treatment or amelioration of a disease resulting from abnormal migration or motility of cells selected from the group consisting of cancer, restenosis and diabetic neuropathy, the method comprising administering to a mammal in need thereof, a pharmaceutically effective amount of an antibody to a peptide according to claim 7.

43. The method of claim 41, wherein the disease is cancer.

44. The method of claim 42, wherein the disease is cancer.

45. A composition for treating or ameliorating a disease resulting from increased cell death or decreased cell proliferation comprising a pharmaceutically effective amount of a peptide according to claim 6, and a pharmaceutically acceptable carrier.

46. A composition for treating or ameliorating a disease resulting from increased cell death or decreased cell proliferation comprising a pharmaceutically effective amount

of a peptide according to claim 7, and a pharmaceutically acceptable carrier.

47. A method for screening agents or drugs which reduce or eliminate sphingosine kinase type 2 activity, the method comprising detecting a decrease in sphingosine kinase type 2 enzyme activity in the presence of said agent or drug.

48. A method for detecting the presence of a sphingosine kinase type 2 isoform in a sample comprising

(i) contacting a sample with antibodies which recognize sphingosine kinase type 2; and

(ii) detecting the presence or absence of a complex formed between sphingosine kinase type 2 and antibodies specific therefor.

49. A method for detecting sphingosine kinase type 2 in a sample comprising subjecting the sample to a polymerase chain reaction and detecting for the presence of sphingosine kinase type 2.

50. A diagnostic kit for detecting sphingosine kinase type 2 RNA/cDNA in a sample comprising primers or oligonucleotides specific for sphingosine kinase type 2 RNA or cDNA suitable for hybridisation to sphingosine kinase type 2 RNA or cDNA and/or amplification of sphingosine kinase type 2 sequences and suitable ancillary reagents.

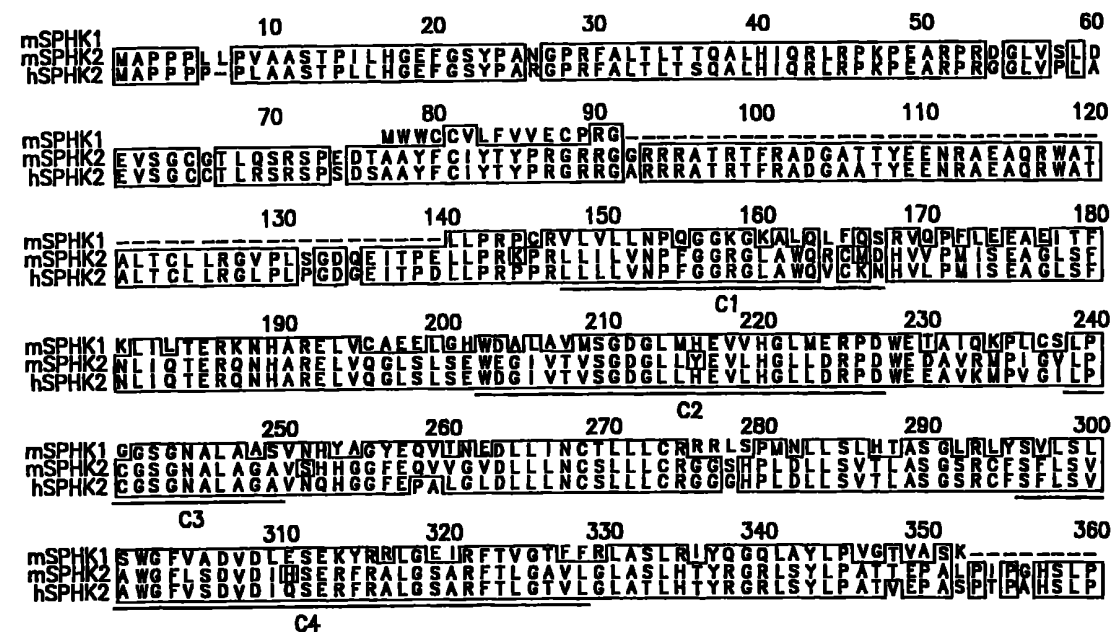


FIG.1A-1

	370	380	390	400	410	420
mSPHK1	RAKSELVLPAPAPAAATHSPLHRSVSDLPPLPQPALYSPGSPPELPPLLSLNGGGPELTG					
mSPHK2	RAKSELVLPAPAPAAATHSPLHRSVSDLPPLPQPALYSPGSPPELPPLLSLNGGGPELTG					
hSPHK2	RAKSELVLPAPAPAAATHSPLHRSVSDLPPLPQPALYSPGSPPELPPLLSLNGGGPELTG					
	430	440	450	460	470	480
mSPHK1	DWGGAGDAPLSPDFLLSSPNALIKTAQLSPITAEGLPEWPAISSGFLPPTHTSAPEASTWGP					
mSPHK2	DWGGAGDAPLSPDFLLSSPNALIKTAQLSPITAEGLPEWPAISSGFLPPTHTSAPEASTWGP					
hSPHK2	DWGGAGDAPLSPDFLLSSPNALIKTAQLSPITAEGLPEWPAISSGFLPPTHTSAPEASTWGP					
	490	500	510	520	530	540
mSPHK1	VDTHLIVPTIEEPVPSHMTIVVPEIDFVLVLLHHTLSSELFAAPMGRICEAGVMHLEIVVRAG					
mSPHK2	VDTHLIVPTIEEPVPSHMTIVVPEIDFVLVLLHHTLSSELFAAPMGRICEAGVMHLEIVVRAG					
hSPHK2	VDTHLIVPTIEEPVPSHMTIVVPEIDFVLVLLHHTLSSELFAAPMGRICEAGVMHLEIVVRAG					
	550	560	570	580	590	600
mSPHK1	VSRAALLRLFLAMQKQKHMEIDCPYLVHVPVVAFRLEPRSRQROVIEISVDGELMVCEAVQIQ					
mSPHK2	VSRAALLRLFLAMQKQKHMEIDCPYLVHVPVVAFRLEPRSRQROVIEISVDGELMVCEAVQIQ					
hSPHK2	VSRAALLRLFLAMQKQKHMEIDCPYLVHVPVVAFRLEPRSRQROVIEISVDGELMVCEAVQIQ					
	610	620	630	C5		
mSPHK1	VHPNLYLWVCGSRDAPSGRDSRRQPPPEEP					
mSPHK2	VHPNLYLWVCGSRDAPSGRDSRRQPPPEEP					
hSPHK2	VHPNLYLWVCGSRDAPSGRDSRRQPPPEEP					

FIG.1A-1

2/11

FIG.1A-2

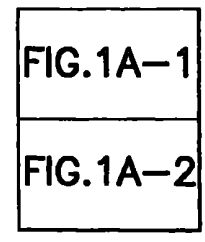


FIG.1A

95

3/11

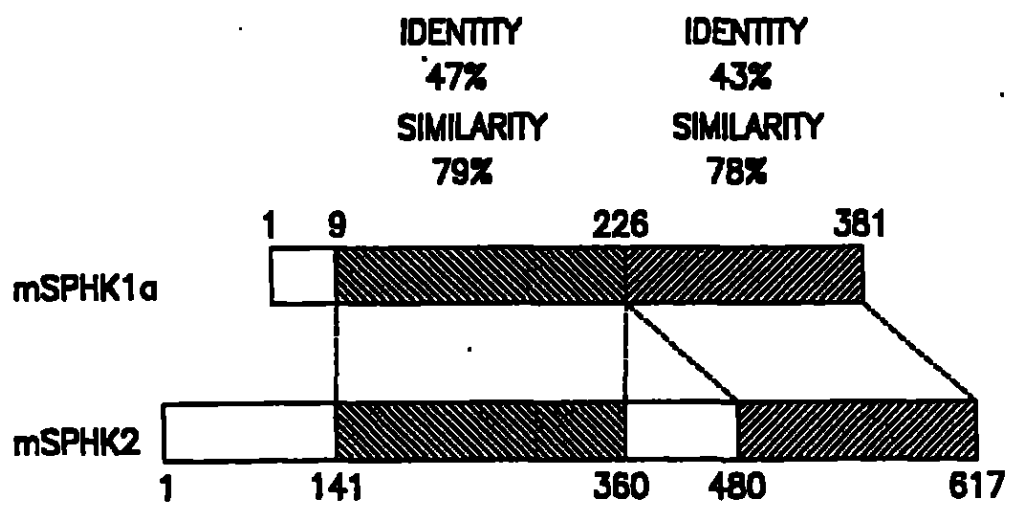
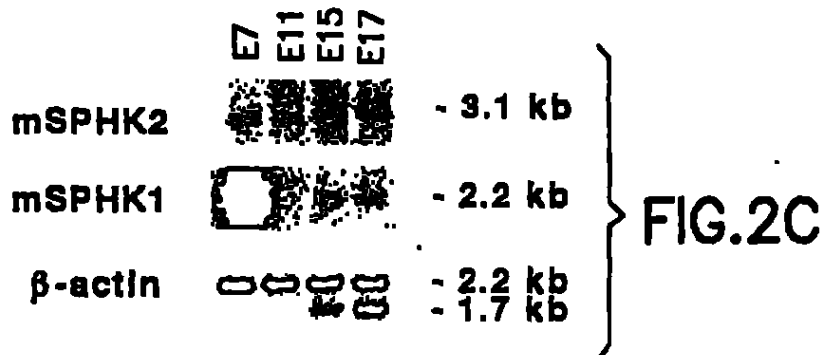
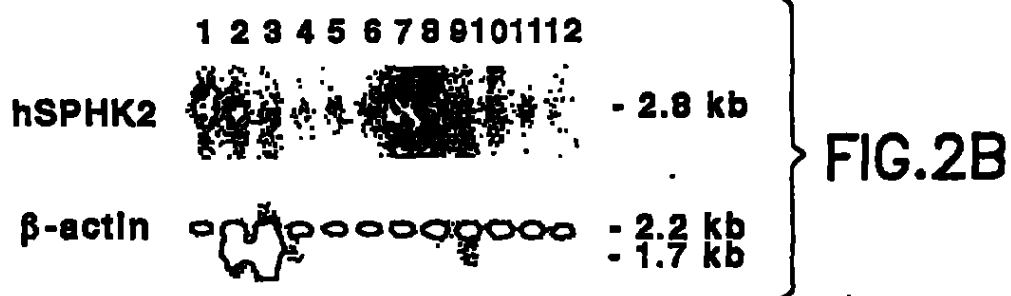
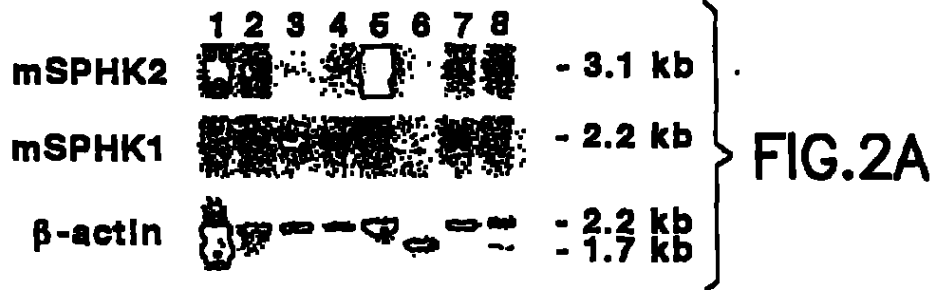


FIG.1B

4/11



5/11

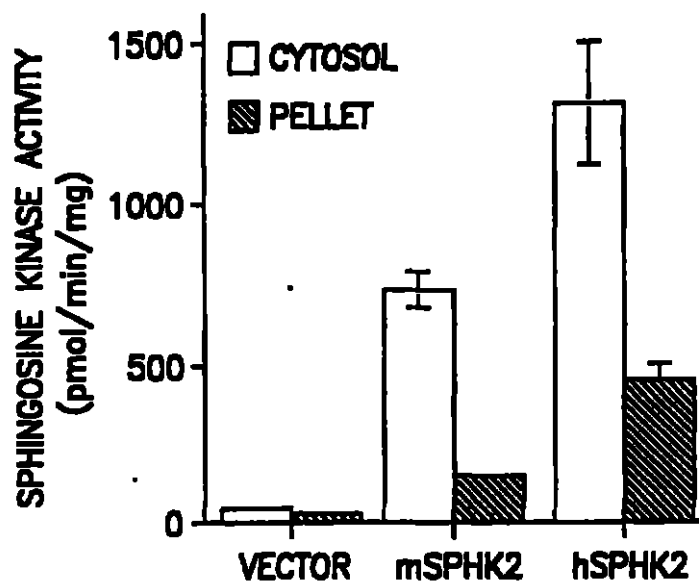


FIG.3A

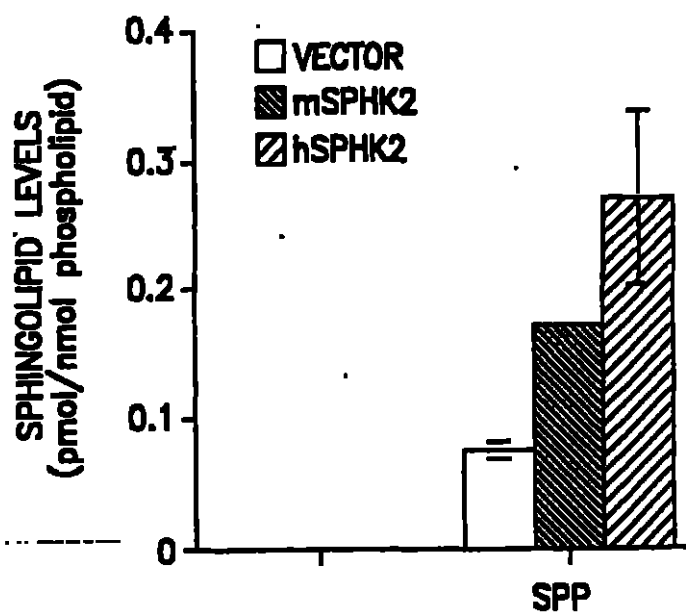


FIG.3B

6/11

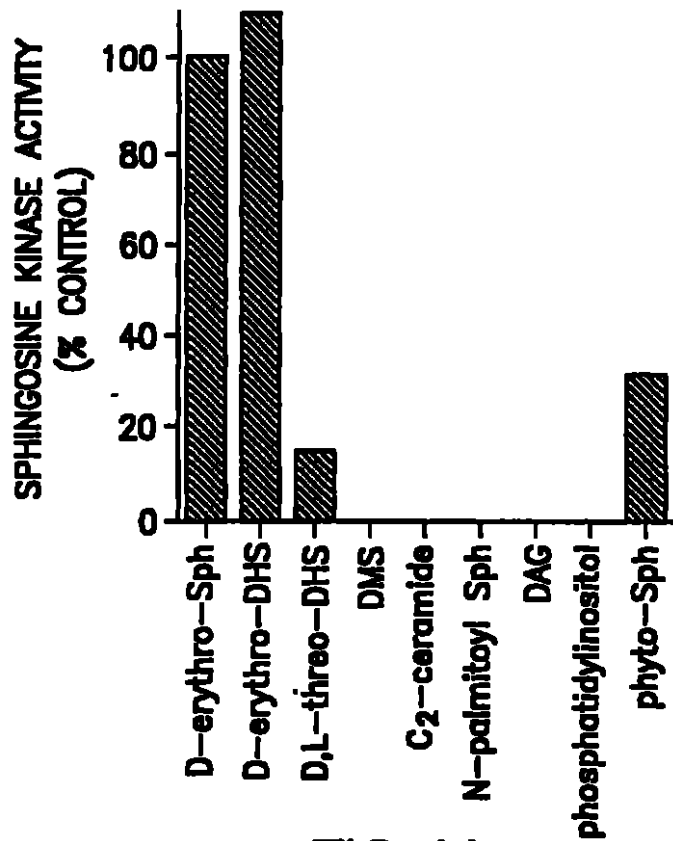


FIG.4A

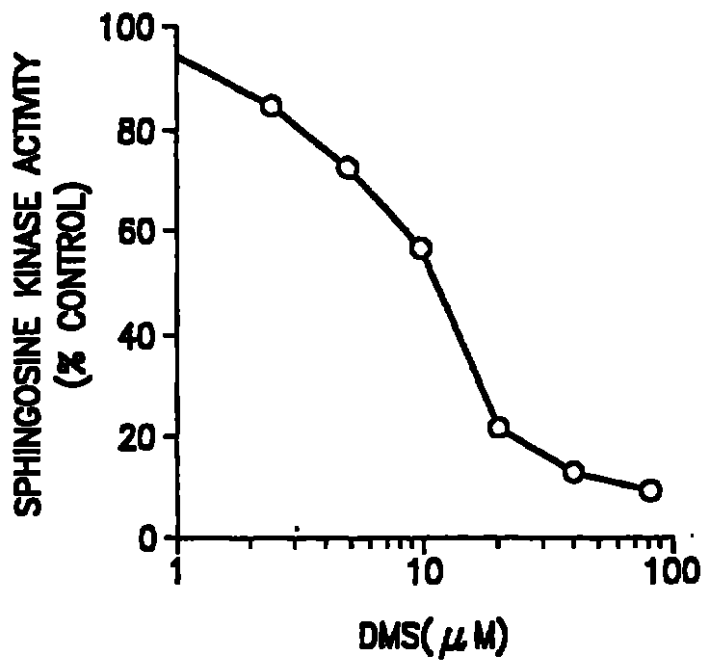


FIG.4B

7/11

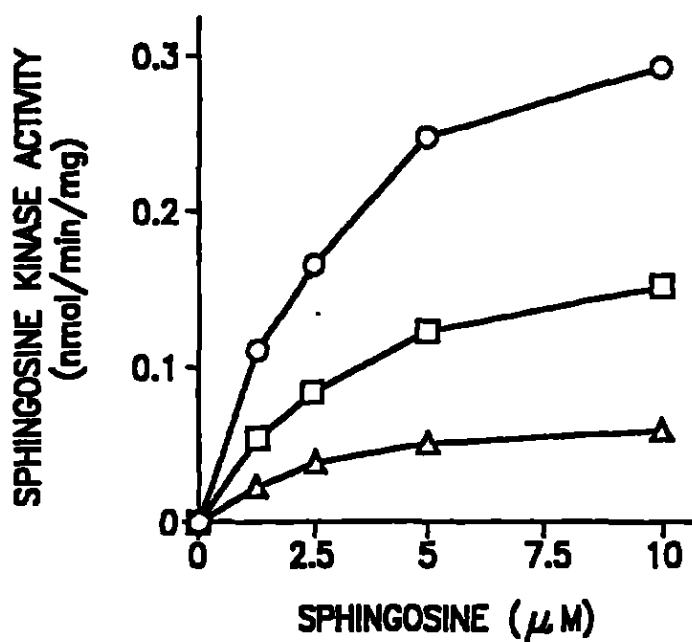


FIG.4C

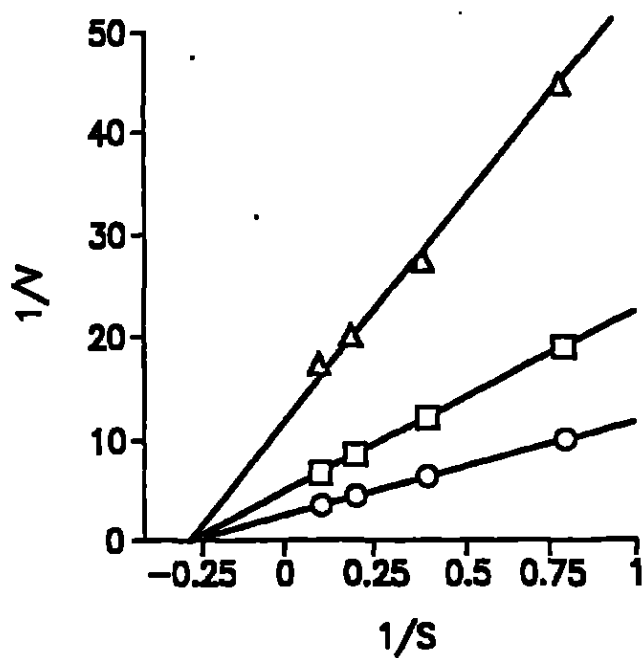


FIG.4D

101

8/11

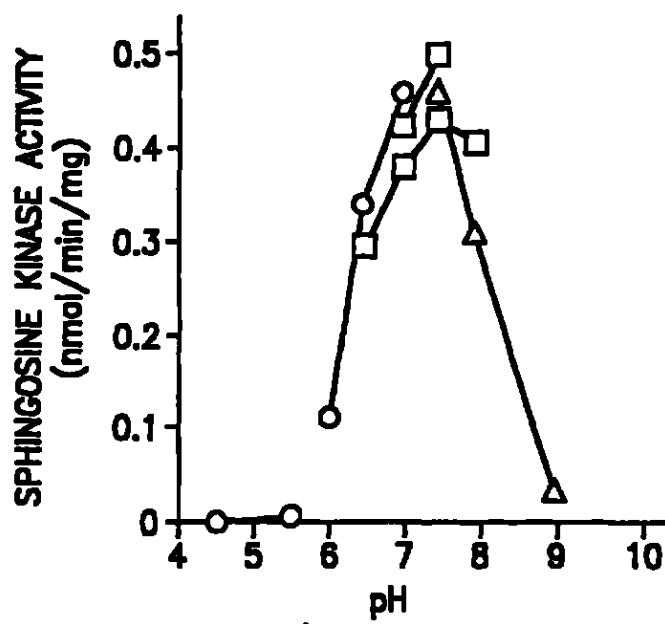


FIG.5A

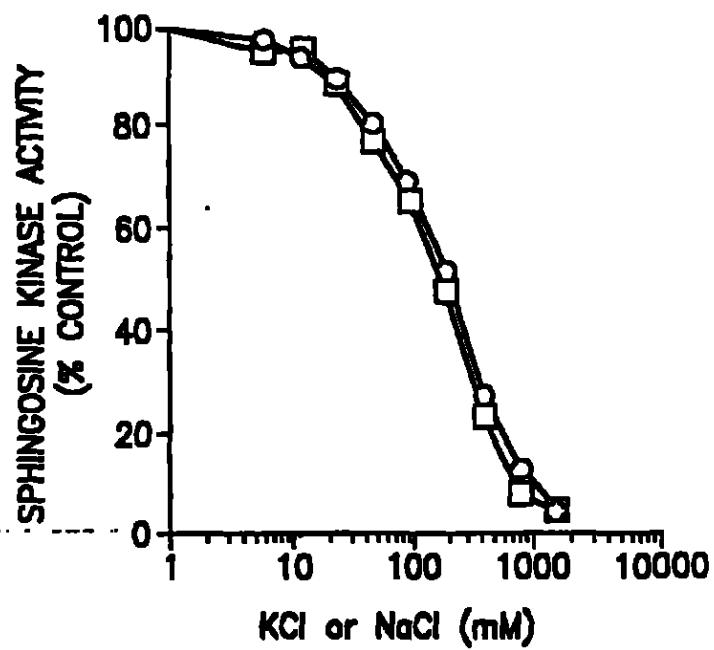


FIG.5B

9/11

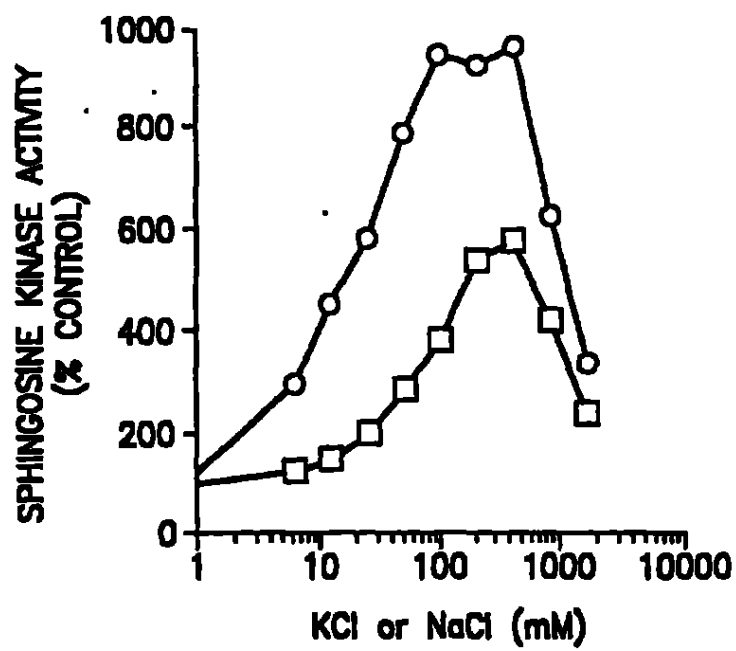


FIG.5C

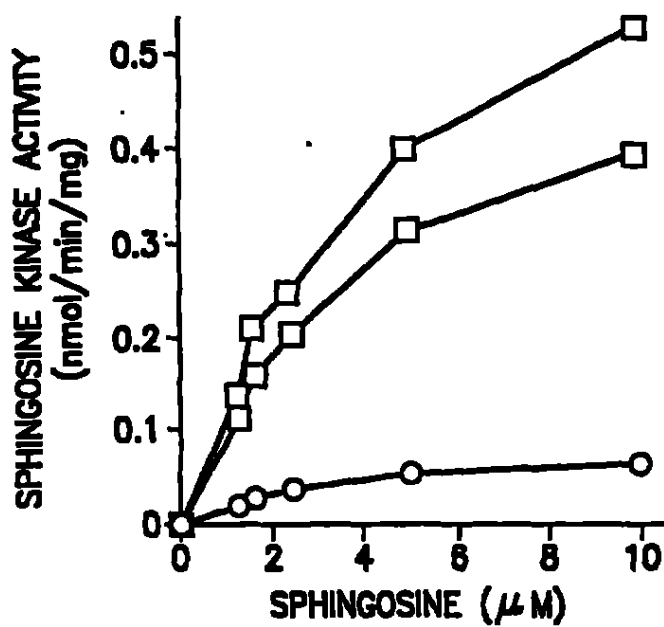


FIG.5D

10/11

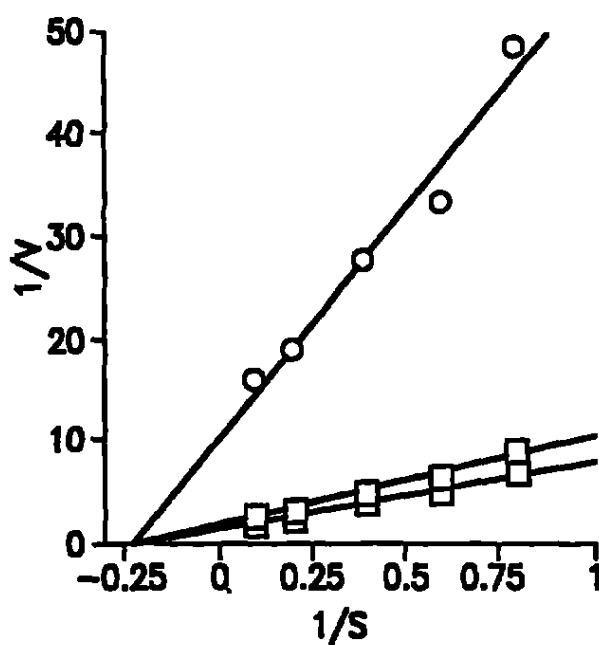


FIG. 5E

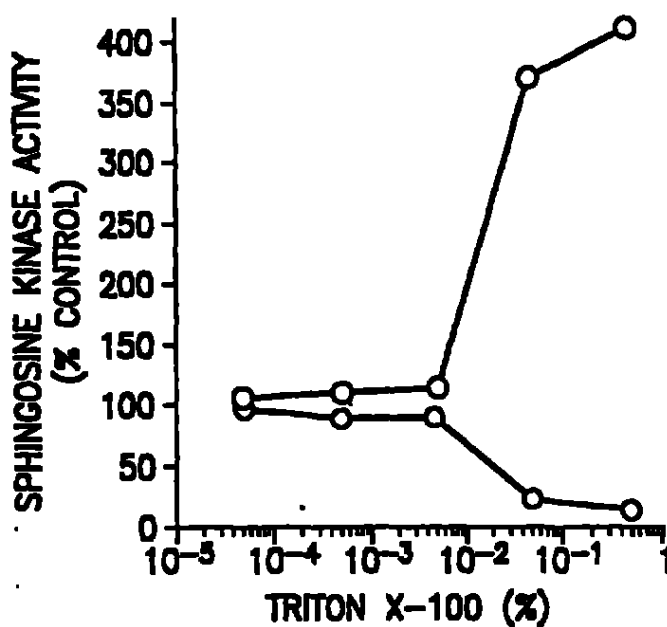
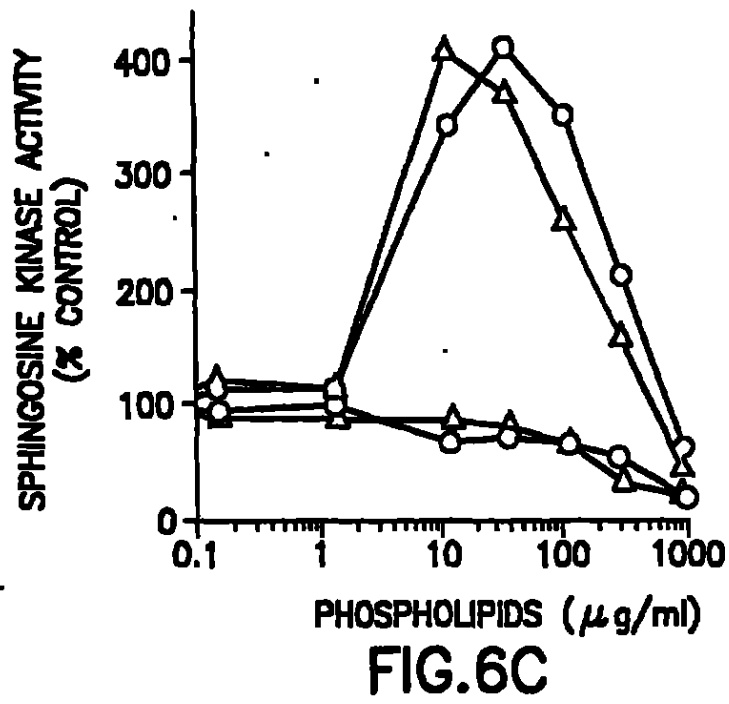
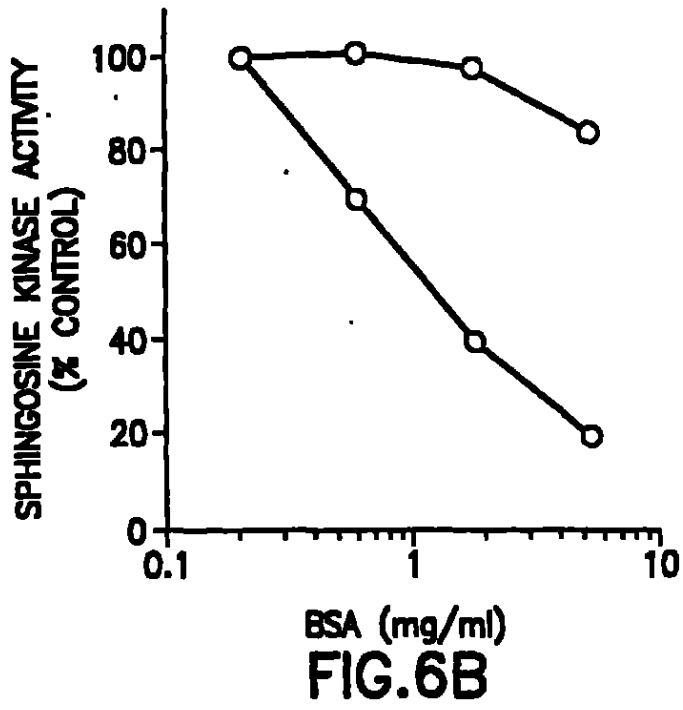


FIG. 6A

104

11/11



105

SEQUENCE LISTING

<110> SANKYO COMPANY, LIMITED
GEORGETOWN UNIVERSITY

<120> Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoforms, Cloning,
Expression and Methods of Use Thereof

<130> 00170PCT/HQ

<140>

<141>

<150> US 60/194,318

<151> 2000-04-03

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cctgggtgaa cctggaggtg tcttgg

28

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

ccagtcttgg ggcagtggag agca

24

2/23

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

agctagagc ttctgg

18

<210> 4

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' RACE

Abridged Anchor Primer

<220>

<221> modified_base

<222> (24).. (25)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (29).. (30)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (34).. (35)

<223> i

<400> 4

ggccacgct cgactagtao gggvvgggnn gggnng

38

<210> 5

3/23

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

ggatgggtg aaagtgago tg

22

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Abridged
Universal Amplification Primer

<400> 8

ggacacggt cgactagtao

20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

agtatcagt cagatatga co

22

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

oocactcact caggct

16

4/23

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaagacaga caagottoag ag

22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

attgaacat agagcaacc

20

<210> 11

<211> 2898

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(2237)

<300>

<302> Molecular cloning and functional characterization of a
novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform

<303> J. Biol. Chem.

<304> 275

<305> 26

<306> 19513-19520

<308> AF245448

<400> 11

5/23

atttcggcag gaggaggac cgagtacac gaggottcca gacccaaga gaagtccgco 60

tgaggaaag gctgggaoco ggagcototo tggcotttca oagtcotgo totaacoto 120

tooagggta aggggnoogg agatocagag aatgatogg agottgotg aogagtcog 180

tgtgaactct otggccgca ggcagocgt totoggtggo tggcgagga ocogrtggc 240

tgtgtgtgg agotccgan gtatgtgaa toacogtct toaacottg gootggotct 300

gocatttana gttgtgatct tggaggotg tooaggagct gaccacago caagagcota 360

ggagtgttg ggaactgaac aggtc atg gcc cca cca cca cta ctg cca gtg 413

Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val

1

5

got gcc ago act cca ato ctg cac gcc gag ttt ggt tcc tao ccg gcc 481

Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala

10

15

20

25

aac gcc cca cgg ttt gcc oto acc oto aca aca cca gcc ota cco ata 509

Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile

30

35

40

cag oga cta cgo cca aag cca gaa gcc cgg ooc cga gat ggt cta gto 557

Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val

45

50

55

tot ctg gat gag gto tgg ggo tgt ggo acc ctg cag ago agt ago ooc 605

Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro

60

65

70

gag gao act gca gcc tao ttc tgc ato tao acc tao oca cgt ggo ogt 653

Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg

75

80

85

oga ggg ggo ogg cgo aga gct acc cgg acc ttc cgg gcc gat ggg gcc 701

Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala

6/23

90 95 100 105
 aac act tat gag gag aat ogt gaa gag gaa cag cga tgg gaa act gaa 749
 Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala
 110 115 120
 etc acg tgt cto cto cga gga gtg oot ctg toa ggg gaa oag gaa ato 797
 Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile
 125 130 135
 aac oot gaa ttg ctg ooo agg aag ooo agg ctg cto ata ttg gto aat 845
 Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn
 140 145 150
 ooo ttt ggg ggg cgg ggo ctg gaa tgg cag cga tgt atg gaa oaa gtg 893
 Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val
 155 160 165
 gtg oaa atg ato tot gaa ggt ggg ctg toa tto aac cto ata cag aca 941
 Val Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr
 170 175 180 185
 gaa cga oag aac cat gaa ogt gag ctg gtg cag ggg tta ago ctg agt 989
 Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser
 190 195 200
 gag tgg gaa gga att gto act gtg tot gaa gaa ggg ctg ott taa gag 1037
 Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu
 205 210 215
 gtg ctg aat ggg cto ott gat ogg oaa gaa tgg gag gat gaa gtg cgg 1085
 Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg
 220 225 230
 atg ooo att ggt gtc cto ooo tgt gaa tog gga aat gag cta gct ggg 1133
 Met Pro Ile Gly Val Leu Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly
 235 240 245

7/23

gag gtg agc cat cat ggc ggc ttt gag cag gtt gto ggt gtt gao ctg 1181
 Ala Val Ser His His Gly Gly Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu
 250 255 260 265

ttg ctc aac tgc tog ott ott cto tgc cgt ggt ggc agc cat cot ctg 1229
 Leu Leu Asn Gys Ser Leu Leu Leu Gys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu
 270 275 280

gac ttg cto tot gtg aag cta ggc tog gga too ego tgt ttt too tto 1277
 Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala Ser Gly Ser Arg Gys Phe Ser Phe
 285 290 295

ctg tca gtg gcc tgg gga ttc ttg tca gat gtg gac att cag agt gag 1325
 Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu
 300 305 310

ego ttc agg gcc ctg ggc agc gct cga ttc aca ctg ggt gca gtg cta 1373
 Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu
 315 320 325

ggc ctg gcc tog ttg cat acc tao cgt gga ego cto tao tao cto acc 1421
 Gly Leu Ala Ser Leu His Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro
 330 335 340 345

gct acc aca gaa cca gcc ttg ccc atc cca ggc cag agt ctg oct cga 1469
 Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg
 350 355 360

gac aag tca gaa cta gto ttg gct cca gcc cca gcc ccc gcc gcc acc 1517
 Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr
 365 370 375

cac tog cot cta cat cga tot gtg tot gag ctg ccc ctg ccc ott acc 1565
 His Ser Pro Leu His Arg Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro
 380 385 390

cag cot gcc ttg gto too cot ggc too cot gag ccc ctg oct gag ctg 1613
 Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu

8/23

112

395

400

405

tcc cto aat ggt ggt ggt oca gag ctg act gga gac tgg gga gga gct 1881
 Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala
 410 415 420 425

ggg gat gaa oot ctg too oca gaa oca ctg ctg oot too too oca aao 1709
 Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn
 430 435 440

gct cto aaa aca gct cag ott too oca atc gct gaa ggg oca oca gaa 1757
 Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu
 445 450 455

atg oca gaa tot tgg ggg tto ctg oot oca aca oca agt goo oca gaa 1805
 Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu
 460 465 470

gcc tot aca tgg gga oca gtg gaa caa cto cto oot oca ctg gga tot 1853
 Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser
 475 480 485

oca ctg oca oca gaa tgg gtg aca ata gag. ggg gag ttt gta cto atg 1901
 Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met
 490 495 500 505

ttg gga ato ttg aag ago oca cto tga gaa gaa ctg atg gaa gaa oca 1949
 Leu Gly Ile Leu Thr Ser His Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro
 510 515 520

cat gaa cga ttt gat gat gga gtt atg caa ctg tgt tgg atg cgg ago 1997
 His Ala Arg Phe Asp Asp Gly Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser
 525 530 535

gga ato too oga gct gaa ott ota oga att ttt ctg gaa atg gag cat 2045
 Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His
 540 545 550

9/23

gga aac cac tto agc ctg ggc tgc ooc cat ctg ggc tat got gca gca 2093
 Gly Ala His Phe Ser Leu Gly Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala
 555 560 565

cgt gcc ttc cgc ott gaa coa cto acg cot cgt ggc ctg cto aot gta 2141
 Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val
 570 575 580 585

gat gag gag tta gtc gag tat ggg coa ata oag gcg oag gtg cao oca 2189
 Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro
 590 595 600

ggt cto gcc aag ctg cto act ggg cot gca ggt caa aag oca caa gcc 2237
 Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
 605 610 615

tgaacgagcc taagaacatg gogagttggt ggaaccagcg ccccatagga taagatetat 2297

cattacagg tagaagtggg gcccgcactc agaatgtga gpaggtgga gattgtctct 2357

gacctoagt toocagagga octagaggt opaggtgga gactgccttt ottgatgton 2417

aatgatggg cotggaatgt atgagctaga aagcttcttt cagcttattg acaagcoagg 2477

gtttcttctt gctactcag gtgcctctac ttgactggcc aatcagcctt taggggag 2537

gttccccag gtggtccca gattgcact aatgttctta cctggcag taggggtg 2597

gatgtctgt gtcttggtg tootctctac tagctaaaa agcaattgaa aaggtctatg 2657

caataaggt tgttgcttcc ctctaaaaa aaaaaaaa a 2698

<210> 12

<211> 617

<212> PRT

<213> Mus musculus

10/23

<400> 12

Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu
1 5 10 15

His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu
20 25 30

Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro
35 40 45

Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly
50 55 60

Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe
65 70 75 80

Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala
85 90 95

Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg
100 105 110

Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly
115 120 125

Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg
130 135 140

Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu
145 150 155 160

Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val Val Pro Met Ile Ser Glu Ala
165 170 175

Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg
180 185 190

Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr

115

11/23

195	200	205
Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp		
210	215	220
Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg Met Pro Ile Gly Val Leu Pro		
225	230	235 240
Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Ser His His Gly Gly		
245	250	255
Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu Leu Leu Asn Gys Ser Leu Leu		
260	265	270
Leu Gys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu		
275	280	285
Ala Ser Gly Ser Arg Gys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe		
290	295	300
Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser		
305	310	315 320
Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu Gly Leu Ala Ser Leu His Thr		
325	330	335
Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu		
340	345	350
Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu		
355	360	365
Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr His Ser Pro Leu His Arg Ser		
370	375	380
Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro		
385	390	395 400

116

12/23

Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro
405 410 415

Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro
420 425 430

Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu
435 440 445

Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe
450 455 460

Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val
465 470 475 480

Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val
485 490 495

Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met Leu Gly Ile Leu Thr Ser His
500 505 510

Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
515 520 525

Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
530 535 540

Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His Gly Asn His Phe Ser Leu Gly
545 550 555 560

Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
565 570 575

Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr
580 585 590

Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr
595 600 605

Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
 610 615

<210> 13

<211> 2380

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (7)..(1880)

<300>

<302> Molecular cloning and functional characterization of a
 novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform

<303> J. Biol. Chem.

<304> 275

<305> 26

<306> 19513-19520

<308> AF245447

<400> 13

gccacc atg gcc cag ccc cca cag cca ctg gct gcc agc acc cag ctc 48
 Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu
 1 5 10

oto aat gga gag ttt gga too tac cca gcc cga gga cca ago ttt gcc 96
 Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala
 15 20 25 30

ctc acc ctt aca tog cag gcc ctg cac ata cag cgg ctg cgc ccc aaa 144
 Leu Thr Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys
 35 40 45

cct gaa gcc agg ccc cgg ggt gcc ctg gtc cag ttg gcc gag gtc tca 192
 Pro Glu Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser

14/23

118

	50	65	80	
ggc tgc tgc acc ctg cga agc agc agc ccc tca gao tca gcg ggc tac				240
Gly Cys Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr				
	65	70	75	
tto tgc atc tac acc tac cct cgg ggc cgg cgc ggg ggc cgg agc aga				288
Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg				
	80	85	90	
ggc acc cgc acc ttc cgg gca gat ggg ggc ggc acc tac gaa gag aac				336
Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn				
	95	100	105	110
cgt ggc gag ggc cag cgc tgg ggc acc ggc ctc acc tgt ctg ctc cga				384
Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg				
	115	120	125	
gga ctg cca ctg ccc ggg gat ggg gag atc acc cct gac ctg cta cct				432
Gly Leu Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro				
	130	135	140	
cgg cgg ccc cgg ttg ctt cta ttg gtc aat ccc ttt ggg gat cgg ggc				480
Arg Pro Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly				
	145	150	155	
ctg ggc tgg cag tgg tgt aag aac cag gtc ott ccc atg atc tot gaa				528
Leu Ala Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu				
	160	165	170	
ggt ggg ctg tcc ttc aac ctc atc cag aca gaa cga cag aac cao gcc				576
Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala				
	175	180	185	190
cgg gag ctg gtc cag ggg ctg agc ctg agt gag tgg gat ggc atc gtc				624
Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val				
	195	200	205	

119

15/23

acg gto tog gga gac gag otg oto cat gag gtg ctg aac gag oto ota 672
 Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu
 210. 215 220

gat cgc cct gac tgg gag gaa gct gtg aag atg cct gtg ggc atc ctc 720
 Asp Arg Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu
 225 230 235

cco tgo ggo tgg ggo aao gag otg gcc gga gaa gtg aao aag oac gag 768
 Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly
 240 245 250

gga ttt gag oca gcc otg ggc oto gac otg ttg cto aao tgo tca ctg 816
 Gly Phe Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu
 255 260 265 270

ttg ctg tgc cgg ggt ggt ggc cac oca ctg gac ctg cto too gtg aag 864
 Leu Leu Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr
 275 280 285

otg goo tgg ggo too ogc tgt tto too tto otg tot gtg goo tgg ggc 912
 Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly
 290 295 300

tto gtg toa gat gtg gat ato aag ago gag ogo tto agg goo ttg ggc 960
 Phe Val Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly
 305 310 315

agt goo cgc tto aca ctg ggc aag gtg ctg ggc oto goo aca otg oac 1008
 Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His
 320 325 330

soo tao ogo gga ogc oto too tao oto oco ggc act gtg gaa cot gcc 1056
 Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala
 335 340 345 350

tgg oco acc cot gcc cat agc otg cct cgt gcc aag tgg gag ctg acc 1104
 Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr

120

16/23

355	360	365	
ota acc cca gac oca gac oag oco atg gac oac tca oco ctg oac agt			1152
Leu Thr Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg			
370	375	380	
tot gtg tot gac ctg oac att oco atg oco cag oac gac ctg gac tct			1200
Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser			
385	390	395	
cct gag tgc cca gaa ccc ctg ccc atc ctg tcc ctc aac gat gag gag			1248
Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly			
400	405	410	
coa gag ctg gat gag gac tag ggt gag gat gat oag ctg tcc			1296
Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser			
415	420	425	430
cag gac cca ctg ctg tct tca cct oac gag tct oco aag gca gat cta			1344
Pro Asp Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu			
435	440	445	
cao tca ccc gtc tcc gaa gag gac ccc gta att ccc oca tcc tct gag			1392
His Ser Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly			
450	455	460	
oto cca att oco acc oac gat gac oag gta gag gac tcc acc tgc gag			1440
Leu Pro Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Gys Gly			
465	470	475	
cag ccc gac oac ctg ctg oac cag ctg gag acc cag ctg ccc oca gac			1488
Pro Pro Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp			
480	485	490	
tgg gtg acg ctg gag gag gac ttt gtg ctc atg ttg gac atc tgc ccc			1536
Trp Val Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro			
495	500	505	510

17/23.

ago cao ota ggo gct gac otg gtg goa gct cag oot gog ogc tto gao 1684
 Ser His Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp
 515. 520 525

gac ggc ctg gtg cao otg tgo tag gtg ogt agc ggo atc tog cgg gct 1692
 Asp Gly Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala
 530 535 540

gog ctg ctg cgc ott tto ttg goo atg gag ogt ggt agc cao tto agc 1680
 Ala Leu Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser
 545 550 555

ctg ggo tgt cag cag otg ggc tao goo ggc gob ogt goo tto ogo cta 1728
 Leu Gly Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu
 560 565 570

gag oag oto aca coa ogo ggo gtg cto aca gtg gac ggc gag cag gtg 1776
 Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val
 575 580 585 590

gag tat ggc cog ota cag gca cag atg cao oot ggc ato ggt aca otg 1824
 Glu Tyr Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu
 595 600 605

oto act ggc oot oot ggo tgo oag ggc cgg gag ooo tgaactaaa 1870
 Leu Thr Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
 610 615

caagcttggt accgcgcggg ggcggggoot acattccaat ggggcggagc ttgagctagg 1930

gggtgtggca tggotgotag agttgtgtg goaggggooo tggocccgto tcaggattgo 1980

gotcgotitto atgggaccag acgtgatgot ggaaggtggc cgtcgtcacg gttasagaga 2050

aatgggctcg tccgagggt agtgootgat caatgaggo gggcctgac gtotgatctg 2110

gggcggccct tacggggcag ggtcagttco tgaogottgo caootgctoo taccgggcca 2170

18/23

ggatggctga gggcggagtc tattttacgc gtgcgccaat gacaggacct ggaatgtact 2230

ggatggctga ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcacg cagcctcgcc cactccactc 2240

cggtcctcc atttagctgg ccantcagcc caggaggggc aggtccccc gggccggcgc 2350

taggatttgc actatgttgc ctctccccc 2380

<210> 14

<211> 618

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu Leu His

1 5 10 15

Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr

20 25 30

Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu

35 40 45

Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser Gly Cys

50 55 60

Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr Phe Cys

65 70 75 80

Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg Ala Thr

85 90 95

Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala

100 105 110

Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Leu

115 120 125

19/23

Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro Arg Pro
 130 135 140

Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala
 145 150 155 160

Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly
 165 170 175

Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu
 180 185 190

Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val Thr Val
 195 200 205

Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg
 210 215 220

Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu Pro Cys
 225 230 235 240

Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly Gly Phe
 245 250 255

Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu
 260 265 270

Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala
 275 280 285

Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Val
 290 295 300

Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala
 305 310 315 320

Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr

20/23

	325		330		335
Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala Ser Pro					
	340		345		350
Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr Leu Thr					
	355		360		365
Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg Ser Val					
	370		375		380
Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser Pro Gly					
	385		390		395
Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu					
	405		410		415
Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp					
	420		425		430
Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu His Ser					
	435		440		445
Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro					
	450		455		460
Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly Pro Pro					
	465		470		475
Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp Trp Val					
	485		490		495
Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro Ser His					
	500		505		510
Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly					
	515		520		525

21/23

Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
 530 535 540

Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser Leu Gly
 545 550 555 560

Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
 565 570 575

Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val Glu Tyr
 580 585 590

Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu Leu Thr
 595 600 605

Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
 610 615

<210> 15

<211> 388

<212> PRT

<213> Mus musculus

<300>

<302> Molecular cloning and functional characterization of
 murine sphingosine kinase

<303> J. Biol. Chem.

<304> 273

<305> 37

<306> 23722-23728

<308> AAC81898

<400> 15

Met Trp Trp Cys Cys Val Leu Phe Val Val Glu Cys Pro Arg Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Arg Pro Cys Arg Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Gln Gly Gly

22/23

20	25	30
Lys Gly Lys Ala Leu Gln Leu Phe Gln Ser Arg Val Gln Pro Phe Leu		
35	40	45
Glu Glu Ala Glu Ile Thr Phe Lys Leu Ile Leu Thr Glu Arg Lys Asn		
50	55	60
His Ala Arg Glu Leu Val Gys Ala Glu Glu Leu Gly His Trp Asp Ala		
65	70	75 80
Leu Ala Val Met Ser Gly Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly		
85	90	95
Leu Met Glu Arg Pro Asp Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu Gys		
100	105	110
Ser Leu Pro Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Val Asn His		
115	120	125
Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu Ile Asn Gys		
130	135	140
Thr Leu Leu Leu Gys Arg Arg Arg Leu Ser Pro Met Asn Leu Leu Ser		
145	150	155 160
Leu His Thr Ala Ser Gly Leu Arg Leu Tyr Ser Val Leu Ser Leu Ser		
165	170	175
Trp Gly Phe Val Ala Asp Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Tyr Arg Arg		
180	185	190
Leu Gly Glu Ile Arg Phe Thr Val Gly Thr Phe Phe Arg Leu Ala Ser		
195	200	205
Leu Arg Ile Tyr Gln Gly Gln Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Thr Val		
210	215	220

23/23

Ala Ser Lys Arg Pro Ala Ser Thr Leu Val Gln Lys Gly Pro Val Asp
225 230 235 240

Thr His Leu Val Pro Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val
245 250 255

Val Pro Glu Gln Asp Phe Val Leu Val Leu Val Leu Leu His Thr His
260 265 270

Leu Ser Ser Glu Leu Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Glu Ala Gly
275 280 285

Val Met His Leu Phe Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Ala Leu
290 295 300

Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Gln Lys Gly Lys His Met Glu Leu Asp
305 310 315 320

Cys Pro Tyr Leu Val His Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu Pro
325 330 335

Arg Ser Gln Arg Gly Val Phe Ser Val Asp Gly Glu Leu Met Val Cys
340 345 350

Glu Ala Val Gln Gly Gln Val His Pro Asn Tyr Leu Trp Met Val Cys
355 360 365

Gly Ser Arg Asp Ala Pro Ser Gly Arg Asp Ser Arg Arg Gly Pro Pro
370 375 380

Pro Glu Glu Pro
385

mSPHK1	10	20	30	40	50	60
mSPHK2	MAPPP LIPVAASTPI LHGEFGSYPANGP PRFALTITQALHIQRLRPKPEARPRDGLVSLD					
hSPHK2	MAPPP P-PLAASTPI LHGEFGSYPARGP PRFALTITQALHIQRLRPKPEARPRDGLVSLA					
mSPHK1	70	80	90	100	110	120
mSPHK2	EVS GCCG T LQSRSP E DTAAYFCI YTYPRGRRG MWWGC V L FVVECPRG					
hSPHK2	EVS GCCC T LRSRSP S DSAA YFCI YTYPRGRRGARRRA TRTFRADGAA TTYEENRAEAQRWAT					
mSPHK1	130	140	150	160	170	180
mSPHK2	---LLPRPCRVLV L LNPQGGKGKALQL FQSRVQPFLEEA EITTF					
hSPHK2	ALTCL LRGVPLSGDQEITPDL LPRPRL L L VNPFGGRGLAWQRCMDHVV PMISEAGLSF					
				C1		
mSPHK1	190	200	210	220	230	240
mSPHK2	KLT L TERKNHARELVCAEELGHWDATAVMSGDGLMHEVVHGLMERPDWEIIA IQKPLCSLP					
hSPHK2	NLIQTERQNHARELVQGLSLSEWDGIVTVSGDGLLEVLHGLLDRPDWE DAVRMPIGVLP					
				C2		
mSPHK1	250	260	270	280	290	300
mSPHK2	GSGNALAISVNHIYAGYEQVINEDLLINCTLLLCRRRLSPMNL LSLHTASGLRILYSVLSL					
hSPHK2	CGSGNALAGAVSHHGGGFEQVVGVDLL LNC SLLLCRGGSHPLDLLSVTLASGSRCSFLSV					
				C3		
mSPHK1	310	320	330	340	350	360
mSPHK2	SWG FVADVDLESEKYRI LGEIRFTVGTFFRILASLRIYQQQLAYLPVGTIVAS K					
hSPHK2	AWGFLSDVDIHSERFRALGSA RFTLGTVLGLATLHTTYRGRLSYLPATTTEPALPI PGHSLP					
				C4		

FIG.1A-1

	370	380	390	400	410	420
mSPHK1				RPA	STLVQKG	
mSPHK2	RAKSELVLA	PAAPAA	THSPLHRSVSD	LPPLPQPALVSPG	SPPEPLP	DI
hSPHK2	RAKSELTL	TPDPAP	MAHSP	MAHSPVSD	LPPLPQPALVSPG	SPPEPLP
						ILSLN
						GGGPELAG
mSPHK1						
mSPHK2	DWGGAGDA	PLSPDP	LLPSSPNAL	KTAKL	SPTAEG	PPPE
hSPHK2	DWGGAGDA	PLSPDP	LLPSSPNAL	KTAKL	SPTAEG	PPPE
mSPHK1	VDITHVPL	EEEPV	PSHMT	VVPEQ	DFVLL	VLLH
mSPHK2	VDHLLPPL	GSPLP	QDWT	IIEGE	FVLM	LIGILL
hSPHK2	PDHLLPPL	GTPLP	PDWT	ILEG	DFVLM	LALISPSH
mSPHK1	VSRAALL	RLFLA	MQKGK	HME	LD	CPYL
mSPHK2	VSRAALL	RLFLA	MEHGN	HFS	LGCP	HLGYA
hSPHK2	ISRAALL	RLFLA	MERGS	HFS	LGCP	QLGYA
mSPHK1	VHPN	YLWM	VCGS	RDAPS	GRDS	RRGPP
mSPHK2	VHPG	IA	TLTG	---	PA	GQK---
hSPHK2	MHPG	I	GTLLTG	---	PG	GP---

C5

FIG.1A-2

FIG.1A-1
FIG.1A-2

FIG.1A

130

3/11

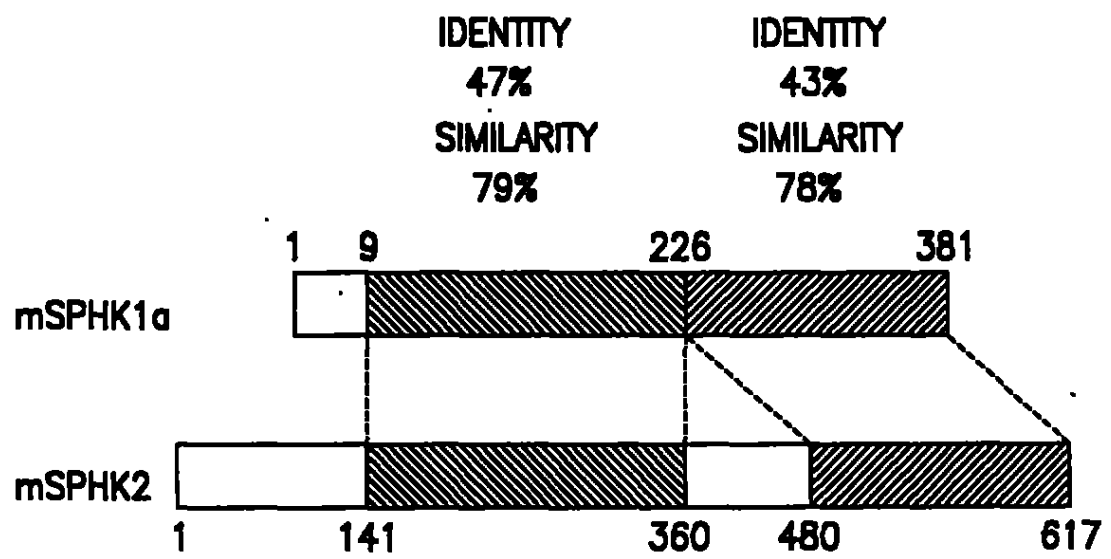
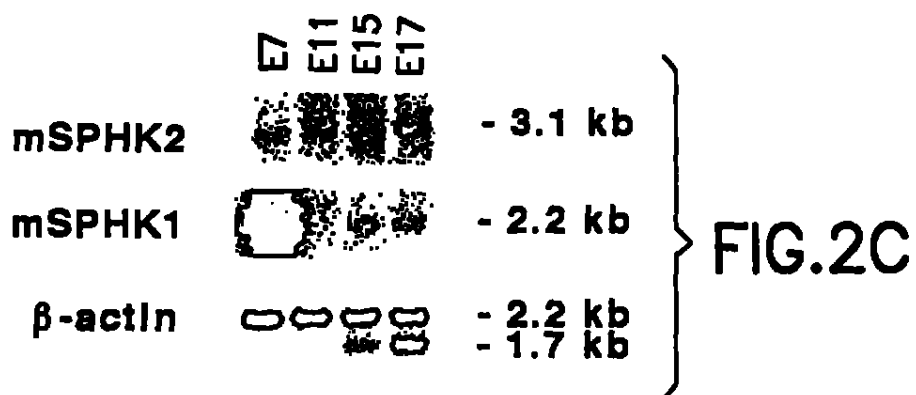
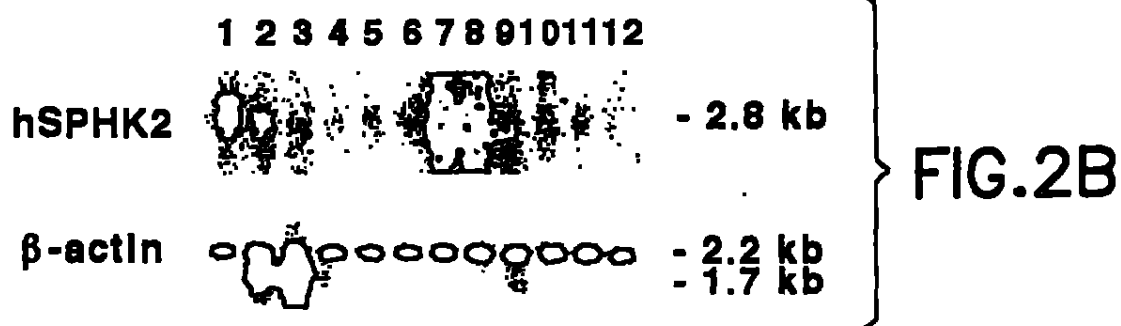
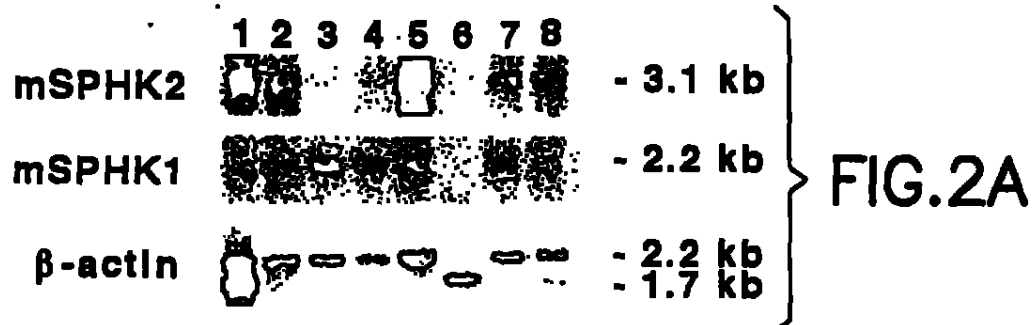


FIG.1B

4/11



5/11

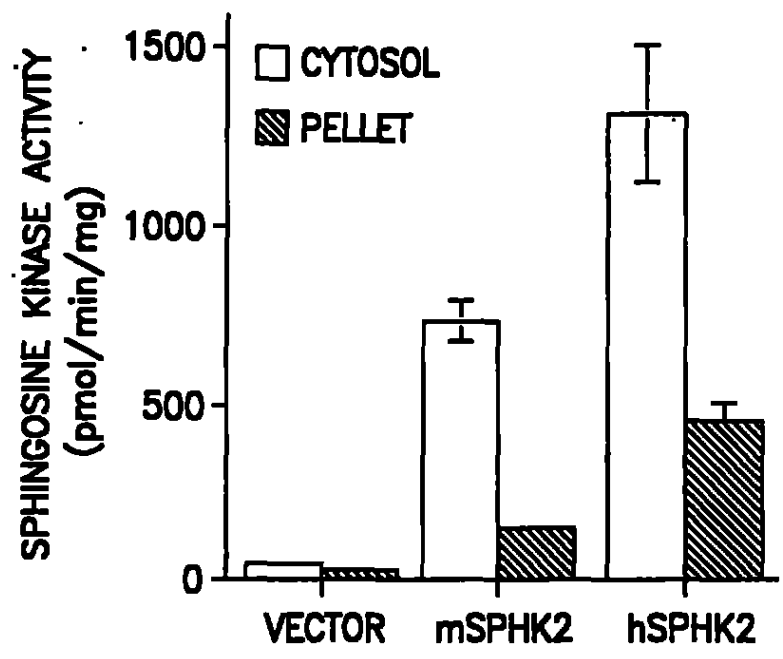


FIG.3A

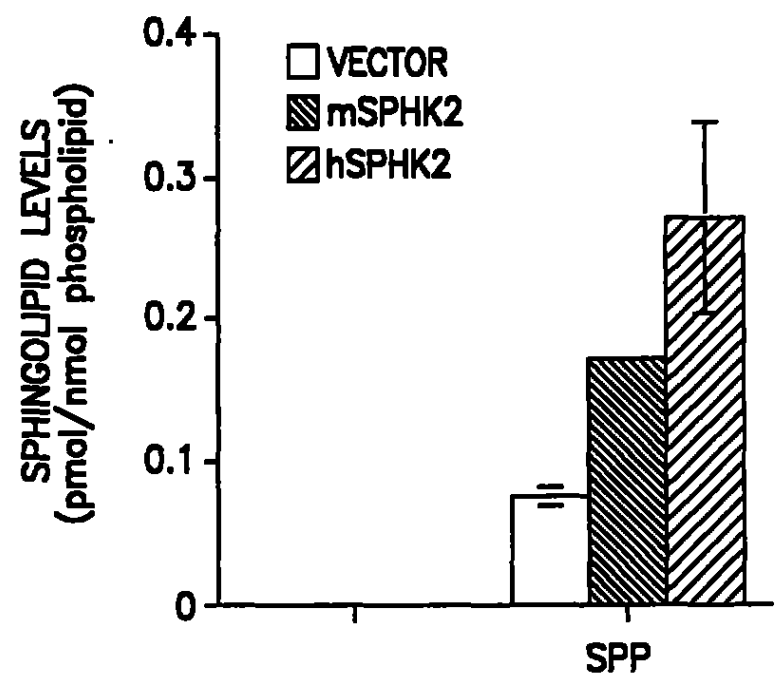


FIG.3B

6/11

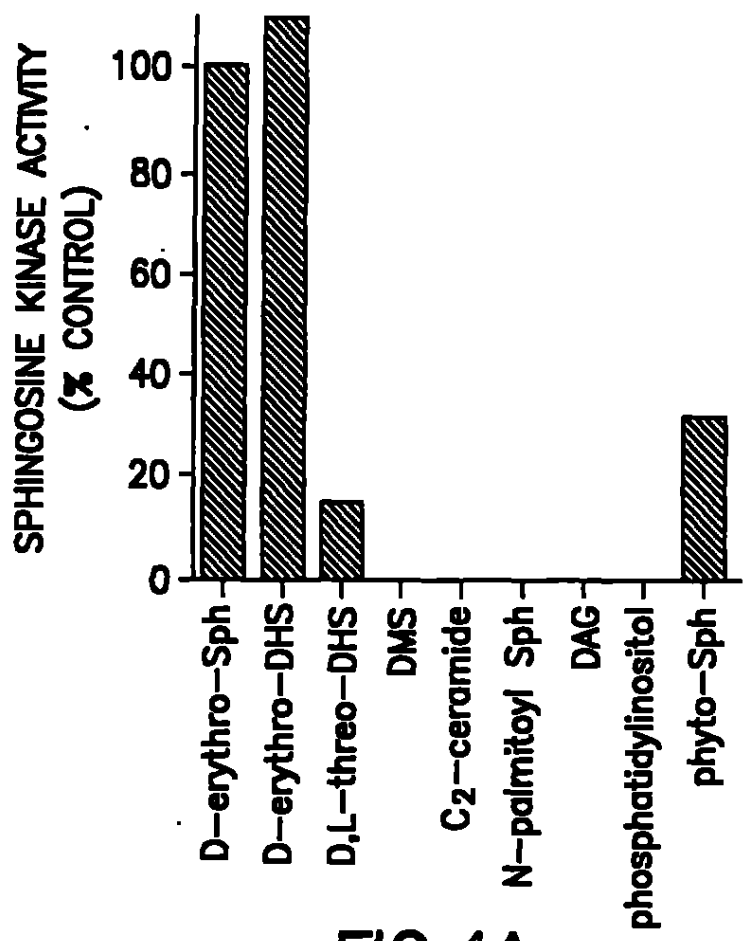


FIG.4A

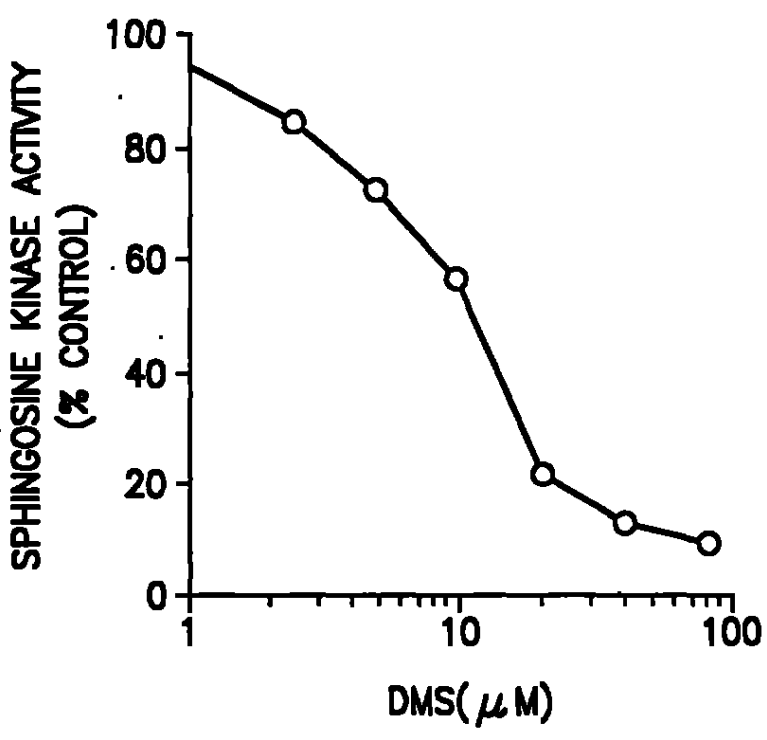


FIG.4B

7/11

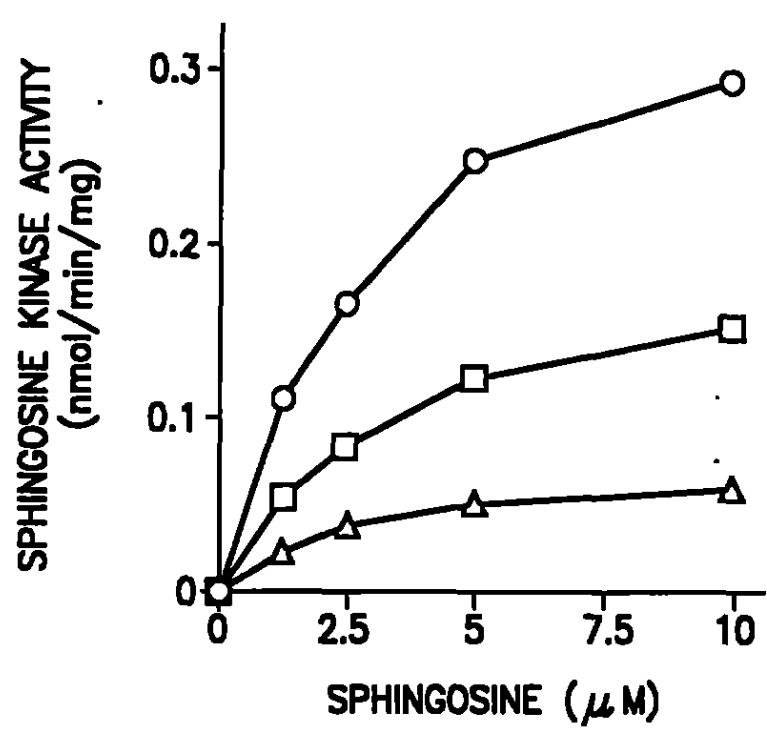


FIG. 4C

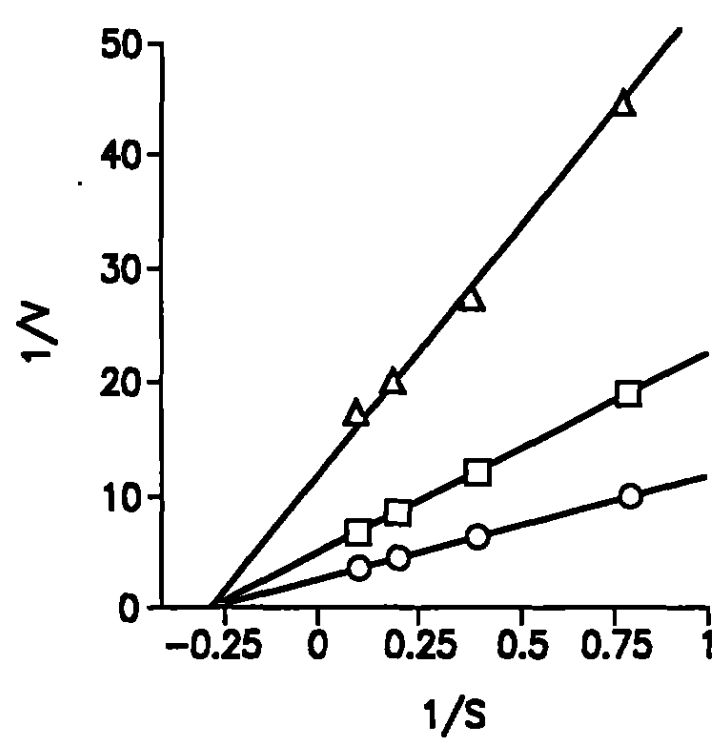


FIG. 4D

8/11

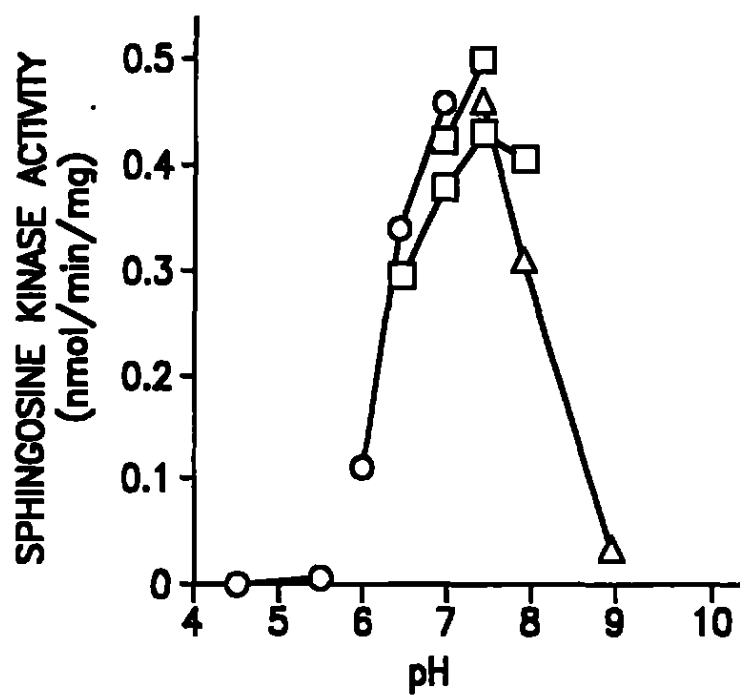


FIG.5A

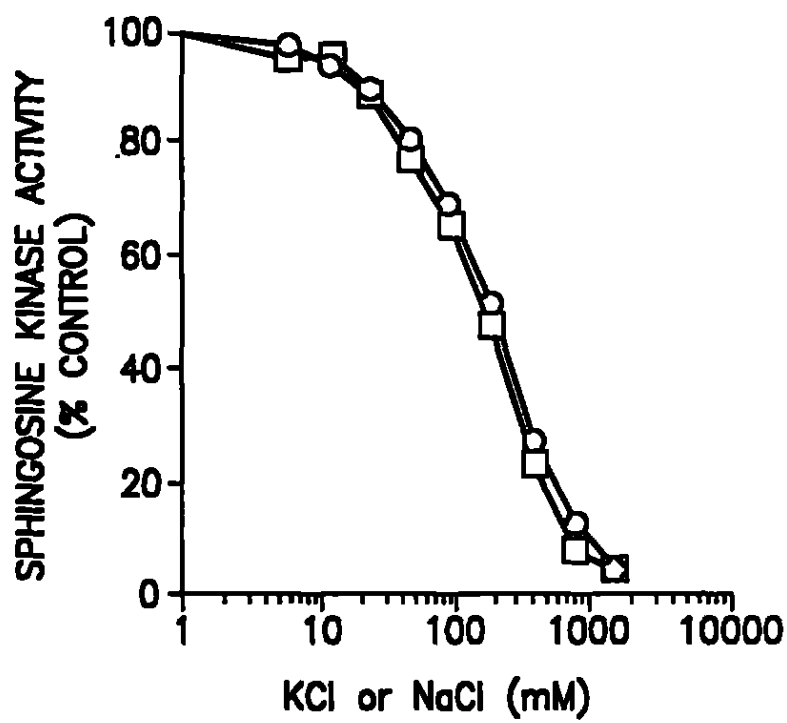


FIG.5B

9/11

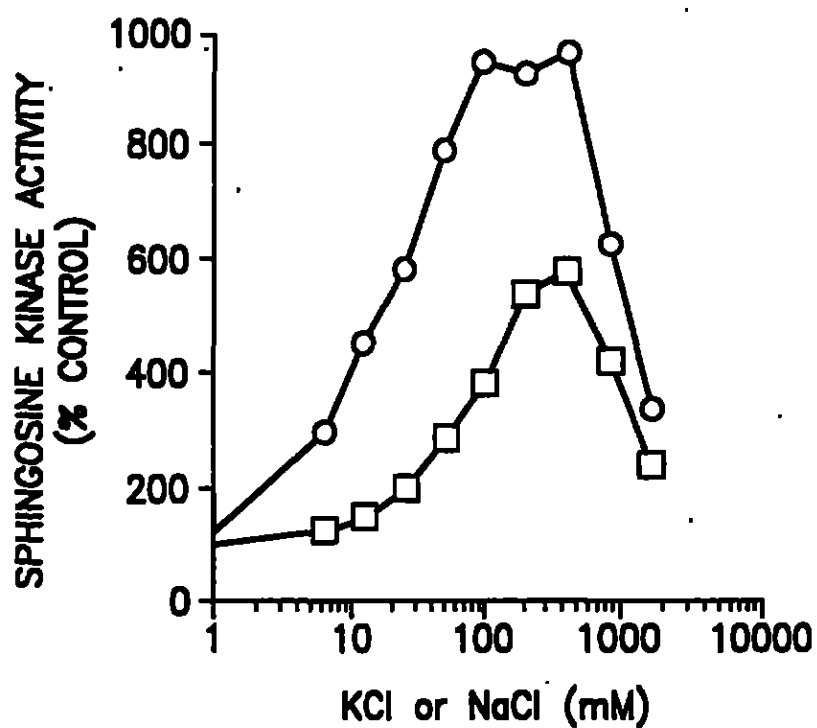


FIG.5C

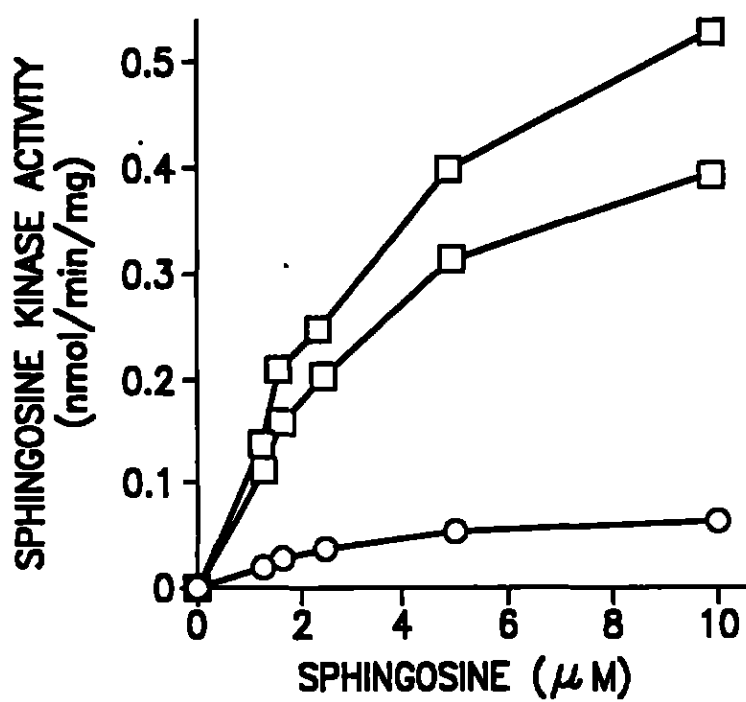


FIG.5D

10/11

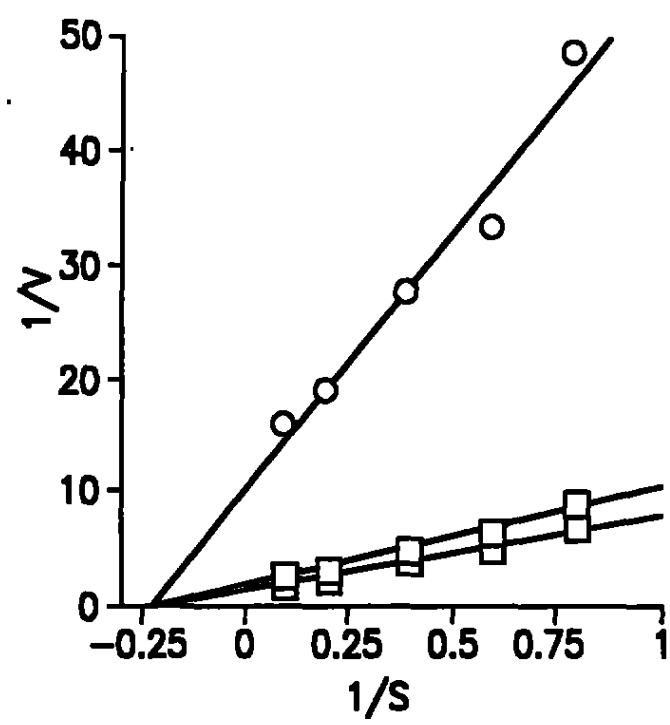


FIG. 5E

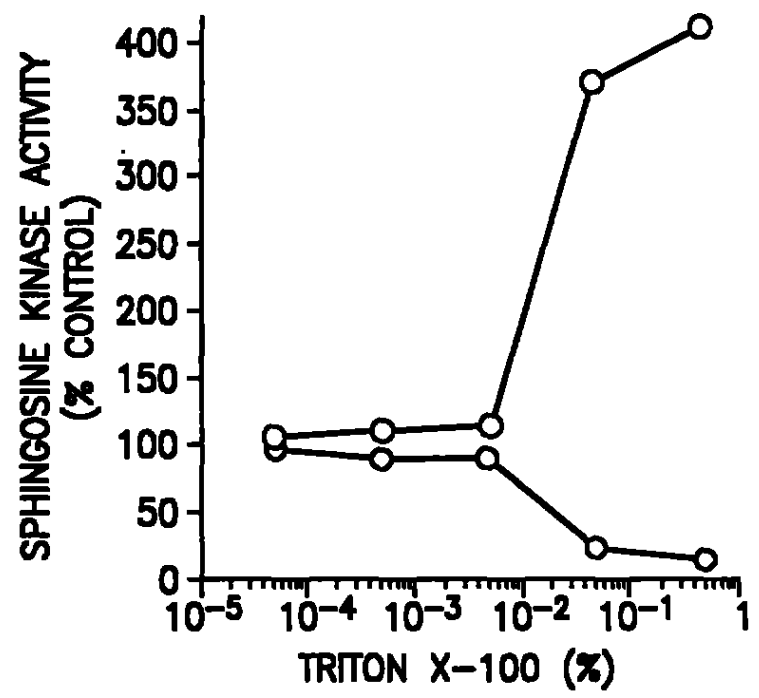


FIG. 6A

11/11

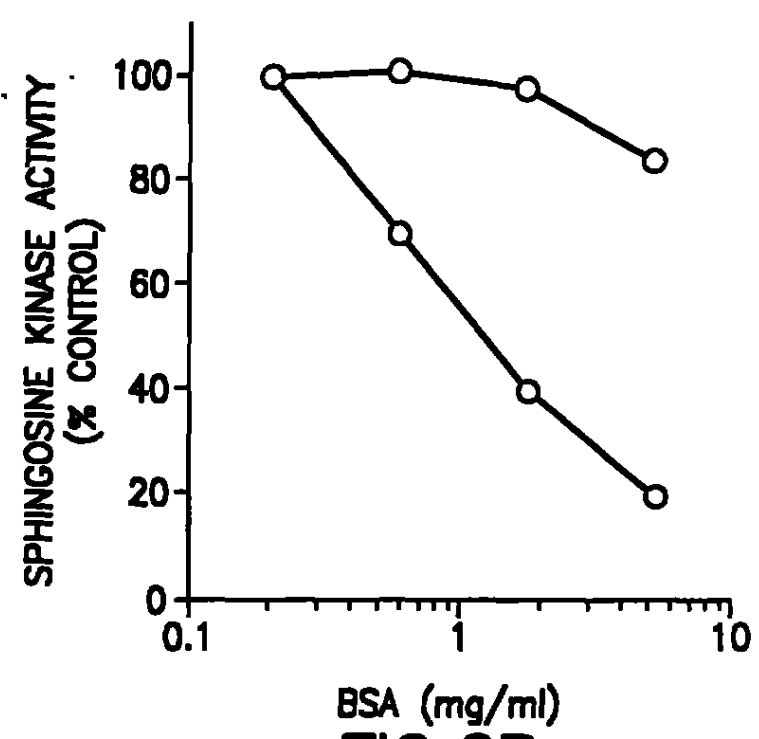


FIG.6B

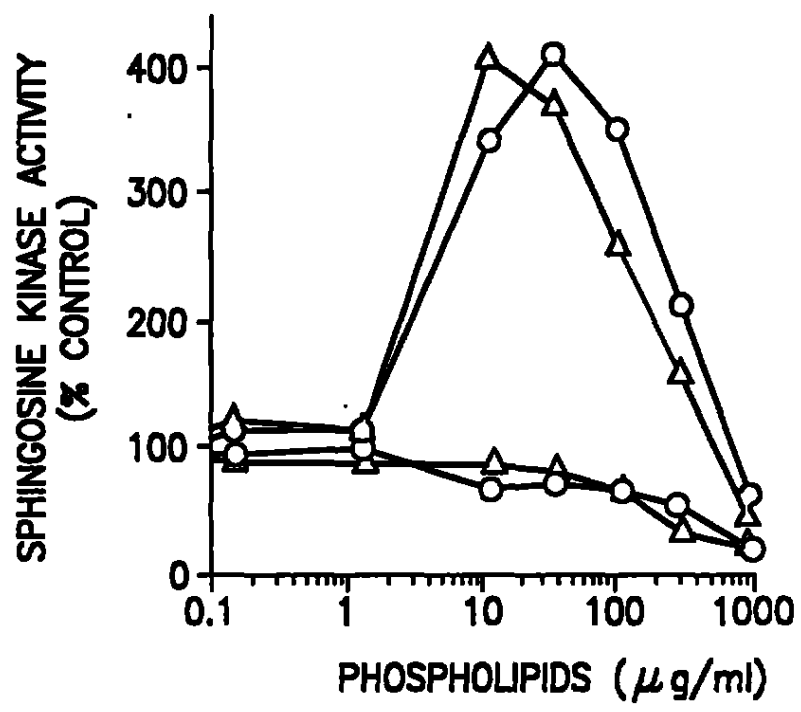


FIG.6C

139

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/09664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC(7) : C07H 21/04; C12N 9/12, 15/63, 5/00, 5/04, 5/06, 1/20, 1/16; C12P 21/06; C12Q 1/48; G01N 33/53; A61K 38/43, 39/393, 31/70 US CL : 536/23.2; 435/194, 320.1, 325, 419, 252.3, 254.11, 69.1, 15, 7.1, 6; 424/94.5, 139.1; 514/44														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.2; 435/194, 320.1, 325, 419, 252.3, 254.11, 69.1, 15, 7.1, 6; 424/94.5, 139.1; 514/44														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched.														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, AGRICOLA, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, WIPDS, PROMT, GENBANK, EMBL														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
P,Y	LIU et al. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Mammalian Sphingosine Kinase Type 2 Isoform J. Biol. Chem. June 2000, Vol 275, No. 26, pages 19513-19520.	1-13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24-26												
A	OLIVERA et al. Sphingosine Kinase: A Mediator of Vital Cellular Functions Prostaglandins April 2001, Vol 64, No. 1-4, pages 123-134.	1-13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 24-26												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td>"A" document member of the same patent family</td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"A" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents:														
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"A" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 03 August 2001 (03.08.2001)		Date of mailing of the international search report 18 SEP 2001												
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20591 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer David J. Steadman Telephone No. (703) 308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/09664

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

[View Images](#)

PCT

World Intellectual Property Organization
International Bureau



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT
COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification⁷ C07H 21/04, C12N 9/12, 15/63, 5/00, 5/04, 5/06, 1/20, 1/16, C12P 21/06, C12Q 1/48, G01N 33/53, A61K 38/45, 39/395, 31/70	A1	(11) International Publication Number WO 01/74837 (43) International Publication Date 11 October 2001 (11.10.2001)
(21) International Application Number PCT/US01/09664 (22) International Filing Date 26 March 2001 (26.03.2001) (30) Priority Data 60/194,318 03 April 2000 (03.04.2000) US 09/817,676 26 March 2001 (26.03.2001) US (71)Applicants: SANKYO COMPANY, LIMITED 5-1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103; (JP). [JP/JP].GEORGETOWN UNIVERSITY 37th & "O" Streets, N.W., Washington, DC 20057; (US). [US/US]. (71)(72) Applicants and Inventors: SPIEGEL, Sarah 6343 Linway Terrace, McLean, VA 22101; (US). [US/US].KOHAMA, Takafumi 1-4-5-614, Motomachi, Kiyose-shi, Tokyo 204- 0021; (JP). [JP/JP]. (74) Agent BARTH, Richard, S. Frishauf, Holtz, Goodman, Langer & Chick, P.C., 767 Third Avenue, New York, NY 10017-2023; (US).		(81) Designated States (national) AE, AG, AL, AM, AT, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW (84) Designated States (regional) ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) <u>For information on time limits</u>

	for entry into the national phase please click here Published <i>with international search report</i> <i>before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments</i>
--	--

142

(54) MAMMALIAN SPHINGOSINE KINASE TYPE 2 ISOFORMS, CLONING,
 Title EXPRESSION AND METHODS OF USE THEREOF
 No Image Available.

(57) Abstract
 Nucleic acids encoding mouse and human sphingosine kinase type 2 isoforms, methods for detecting agents or drugs which inhibit or promote sphingosine activity and therapeutic agents containing peptides or antibodies to peptides encoded by such nucleic acids.

ISOFORMAS DE ESFING SINA CINASA TIPO 2 DE MAMIFERO, CLONACION,**EXPRESION Y METODOS DE USO DE LAS MISMAS****INTERREFERENCIA CON SOLICITUD RELACIONADA**

5

La presente solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional No. de serie 60/194,318, presentada el 3 de abril de 2000, en donde se reclama prioridad bajo 35 USC 119(e).

10

DERECHOS GUBERNAMENTALES

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo la concesión GM 43880 del "National Institutes of Health" y una beca posdoctoral BC961968 del "United States Army Medical Research and Material Command, Prostate Cancer Research Program (VEN)". El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

20

La presente invención se refiere a isoformas de esfingosina cinasa tipo 2 de mamífero (por ejemplo ratón y humano), la clonación molecular de dichas isoformas y métodos de uso de dichas isoformas. La esfingosina cinasa tipo 2 tiene distintas características cuando se compara con esfingosina cinasa tipo 1.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esfingosina-1-fosfato (SPP) es un metabolito esfingolípido bioactivo que regula diversos procesos biológicos actuando tanto dentro de las células como

un mensajero secundario para regular la proliferación y supervivencia, como fuera de las células como un ligando para los receptores acoplados a proteína G de la subfamilia de EDG-1 (Spiegel, S., J. Leukoc. Biol., **65**, (1999), 341-344; Goetzl, E.J., An, S. FASEB J., **12**, (1998), 1589-1598). De esta manera, la SPP desempeña

5 funciones importantes como un mensajero secundario para regular el crecimiento y supervivencia celular (Olivera, A., Spiegel, S., Nature, **365**, (1993), 557-560; Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S., y Spiegel, S., Nature, **381**, (1996), 800-803).

Muchos estímulos externos, particularmente factores de crecimiento y

10 supervivencia, activan esfingosina cinasa ("SPHK"), la enzima que forma SPP a partir de esfingosina. La lista, en rápido crecimiento, incluye factor de crecimiento derivado de plaqueta ("PDGF") (Olivera, A., Spiegel, S., Nature, **365**, (1993), 557-560; Pyne, S., Chapman, J. Steele, L., y Pyne, N.J., Eur. J. Biochem., **237**, (1996), 819-826; Coroneos, E., Martinez, M., McKenna, S. y Kester, M., J. Biol. Chem., **270**, (1995),

15 23305-23309), factor de crecimiento de nervio ("NGF") (Edsall, L. C., Pirianov, G. G., y Spiegel, S., J. Neurosci., **17**, (1997), 6952-6960; Rius, R.A., Edsall, L.C. y Spiegel, S., FEBS Lett., **417**, (1997), 173-176), vitamina D3 (Kleuser, B., Cuvillier, O. y Spiegel, S., Cancer Res., **58**, (1998) 1817-1824), agonistas muscarínicos de acetilcolina (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K.T., Neumann,

20 E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H. y van Koppen, C.J., EMBO J., **17**, (1998), 2830-2837), TNF- α (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J. y Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, (1998), 14196-14201), y el entrecruzamiento de los receptores de inmunoglobulina Fc ϵ R1 (Choi, O. H., Kim, J.-H. y Kinet, J.-P., Nature, **380**, (1996),

25 634-636) y Fc γ R1 (Melendez, A., Floto, R. A., Gilleooly, D. J., Harnett, M. M. y Allen, J.M., J. Biol. Chem., **273** (1998), 9393-9402).

El SPP intracelular, a su vez, moviliza calcio de depósitos internos independientemente de InsP3 (Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R.,

Laser, K.T., Neumann, E. Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K.H. y van Koppen, C.J., EMBO J., **17**, (1998), 2830-2837; Mattie, M., Brooker, G. y Spiegel, S., Biol. Chem., **269**, (1994), 3181-3188), y también evoca diversas rutas de señalización que conducen a proliferación (Rani, C.S., Berger, A., Wu, J., Sturgill, T. W., Beitner-Johnson, D., LeRoith, D., Varticovski, L. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **272**, (1997), 10777-10783; Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T. y Spiegel, S., J. Cell Biol., **142**, (1998), 229-240) y supresión de apoptosis (Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S. y Spiegel, S., Nature, **381**, (1996), 800-803; Edsall, L. C., Pirianov, G. G. y Spiegel, S., J. Neurosci., **17**, (1997), 6952-6960; Van Brocklyn, J.R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T. y Spiegel S., J. Cell Biol., **142**, (1998), 229-240).

Además, los inhibidores competitivos de esfingosina cinasa bloquean la formación de SPP e inhiben selectivamente la movilización de calcio, la proliferación celular y la supervivencia inducida por estos varios estímulos (Spiegel, S., J. Leukoc. Biol., **65**, (1999), 341-344). Así, se ha sugerido que el balance dinámico entre los niveles de metabolitos esfingolpidos, ceramida y SPP, y la regulación consiguiente de rutas de señalización opuestas, es un factor importante que determina el destino de las células (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 2910-2916). Por ejemplo, estímulos de tensión aumentan los niveles de ceramida conduciendo a apoptosis, mientras que factores de supervivencia estimulan SPHK conduciendo a incrementos del nivel de SPP, lo que suprime la apoptosis (Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 2910-2916).

Además, la ruta de SPHK, a través de la generación de SPP, está involucrada críticamente en la mediación de activación de células endoteliales inducida por TNF- α (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill,

P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J. y Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, (1998), 14196-14201), y la capacidad de lipoproteínas de alta densidad (HDL) para inhibir la expresión de molécula de adhesión inducida por citocina se ha correlacionado con su capacidad para restablecer este reóstato de esfingolípido (Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S.T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J. y Vadas, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, (1998), 14196-14201). Esto tiene implicaciones importantes para la función protectora de HDL contra el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad coronaria asociada. Datos recientes también han relacionado el reóstato de esfingolípido con respuestas alérgicas (Prieschl, E., E., Csonga, R., Novotny, V., Kikuchi, G. E. y Baumruker, T., J. Exp. Med., **190**, (1999), 1-8).

El interés en SPP se ha acelerado recientemente con el descubrimiento de que es un ligando del receptor EDG-1 de superficie celular acoplado con proteína G (Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Hla, T., y Spiegel, S., J. Cell Biol., **142**, (1998), 229-240; Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S. y Hla, T., Science, **279**, (1998), 1552-1555). Esto condujo rápidamente a la identificación de varios otros receptores relacionados, denominados EDG-3, -5, -6, y -8, que también son receptores de SPP específicos (Goetzl, E. J. y An, S., FASEB J., **12**, (1998), 1589-1598; Spiegel, S. y Milstein, S., Biochem. Biophys. Acta., **1484**(2-3):107-116, (2000)).

El esfinganina-1-fosfato, que es estructuralmente similar a SPP y carece solo del doble enlace trans en la posición 4, pero no el ácido lisofosfatídico ni esfingosilfosforilcolina, también se une a estos receptores (Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **274**, (1999) 4626-4632), demostrando que EDG-1 pertenece a una familia de receptores acoplados a proteína G que unen SPP con alta afinidad y especificidad (Goetzl, E. J. y An, S., FASEB J., **12**, (1998), 1589-1598; Spiegel, S. y Milstien, S., Biochem. Biophys. Acta., **1484**(2-

3):107-116, (2000)).

La familia EDG-1 de receptores es expresada diferencialmente, principalmente en los sistemas cardiovascular y nervioso, y está acoplada a una variedad de proteínas G y por lo tanto pueden regular diversas rutas de transducción que culminan en respuestas pleiotrópicas dependiendo del tipo de célula y la expresión relativa de receptores EDG. Aunque las funciones biológicas de la familia EDG-1 de GPCRs no se entienden completamente, estudios recientes sugieren que la unión de SPP a EDG-1 estimula la migración y quimiotaxis (Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., y Spiegel, S. J. Biol. Chem., **274**, (1999), 35343-35350; English, D., Kovala, A. T., Welch, Z., Harvey, K. A., Siddiqui, R. A., Brindley, D. N. y Garcia, J. G., J. Hematother. Stem Cell Res., **8**, (1999), 627-634), y como consecuencia, puede regular angiogénesis (Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S. y Spiegel, S. J. Biol. Chem., **274**, (1999), 35343-35350; Lee, O. H., Kim, Y. M., Lee, Y. M., Moon, E. J., Lee, D. J., Kim, J. H., Kim, K. W. y Kwon, Y. G., Biochem. Biophys. Res. Commun., **264**, (1999) 743-750; Lee, M. J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellini, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi, Sha'afi, R. I. y Hla, T., Cell, **99**, (1999), 301-312). EDG-5 puede tener una función en reorganización citoesquelética durante retracción de neurita, que es importante para diferenciación y desarrollo neuronal (Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L. C., Schmidt, R. R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **274**, (1999), 4626-4632; MacLennan, A. J., Marks, L., Gaskin, A. A. y Lee, N., Neuroscience, **79**, (1997), 217-224).

La evaluación crítica de la función de SPP requiere clonación de las enzimas que regulan su metabolismo. Recientemente se ha purificado SPHK de riñón de rata hasta homogeneidad aparente (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 12576-12583) y subsecuentemente se clonó el primer SPHK de mamífero, designado como mSPHK1 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998),

23722-23728). Independientemente, también se mostró que dos genes, denominados LCB4 y LCB5, codifican para SPHKs en *Saccharomyces cerevisiae* (Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L. y Dickson, R. C., J. Biol. Chem., **273**, (1998) 19437-19442). Además, bases de datos identifican homólogos de mSPHK1 en numerosos organismos ampliamente distintos, incluyendo gusanos, plantas y mamíferos, demostrando que la enzima es codificada por un miembro de una familia de gen altamente conservado (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 23722-23728). La comparación de las secuencias de aminoácidos predichas de los SPHK1s conocidos reveló cinco bloques de aminoácidos altamente conservados (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 23722-23728). Sin embargo, varias líneas de evidencia indican que puede haber múltiples isoformas de SPHK de mamífero.

El hallazgo de que la actividad de SPHK en plaquetas podría ser fraccionada cromatográficamente en varias formas con diferentes respuestas a detergentes e inhibición por inhibidores de SPHK conocidos, indica la presencia de formas de enzima múltiples en plaquetas humanas (Banno, Y., Kato, M., Hara, A. y Nozawa, Y., Biochem. J., **335**, (1998), 301-304). Más aún, búsquedas de homología contra una base de datos no redundante comprensiva reveló que varias de las marcas de secuencia expresadas (dbEST) en NCBI tenían homología significativa con dominios conservados de mSPHK1 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 23722-23728); no obstante tenían diferencias sustanciales de secuencia.

La patente de E.U.A. No. 5,374,616 se refiere a composiciones que contienen esfingosilfosforilcolina para promover proliferación celular de células de mamífero.

WO 99/61581 describe fragmentos de ADN que codifican esfingosina SPHK1a (381 aminoácidos) y SPHK1b (388 aminoácidos) de murino.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proveer ADNs aislados y purificados que codifican isoformas de esfingosina cinasa tipo 2 de mamífero (por ejemplo un ratón o humano), y péptidos codificados de los mismos.

Un objeto mas de la presente invención es proveer construcciones de ADN recombinante que comprenden un vector y los ADNs arriba descritos, y células hospederas transformadas con dichas construcciones de ADN recombinante.

Otro objeto de la presente invención es proveer un método para producir péptidos de isoforma de esfingosina tipo 2 de ratón y de humano cultivando dichas células hospederas.

Un objeto adicional de la presente invención es proveer un método para detectar un agente o un fármaco que inhibe o promueve la actividad de esfingosina cinasa.

Otro objeto de la presente invención es proveer un método para regular un proceso biológico; para tratar o aliviar una enfermedad que resulta de proliferación celular aumentada o disminuida o muerte celular aumentada o disminuida; y para tratar o aliviar una enfermedad que resulta de migración o motilidad anormal de células, tales como cáncer, restenosis o neuropatía diabética.

La presente invención también está dirigida a un ADN aislado y purificado que codifica un péptido de isoforma de esfingosina cinasa tipo 2, el ADN comprendiendo una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la secuencia del acceso de Genbank No. bankit325787, y la secuencia de acceso de Genbank No. bankit325752.

La presente invención también se refiere a métodos para detectar un agente o un fármaco que inhibe o promueve la actividad de esfingosina cinasa tipo 2, que comprende:

(a) proveer una construcción de ADN recombinante como la que se mencionó arriba en una célula, de modo que sea producida en la célula isoforma de esfingosina cinasa tipo 2;

(b) agregar por lo menos un fármaco o agente a la célula, y

5 (c) detectar si el fármaco o agente inhibe o promueve la actividad de esfingosina cinasa tipo 2, o no lo hace, midiendo la fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en las células, y comparando la medición resultante con un control que no recibe el fármaco o el agente, en donde una reducción en la cantidad de fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina
10 cinasa en comparación con el control, indica un fármaco o agente inhibidor; o un aumento en la cantidad de fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en la célula en comparación con el control, indica un fármaco o agente estimulador.

Como se describe arriba, la presente invención también se refiere a métodos de regulación de un proceso biológico (tales como mitogénesis, apoptosis,
15 desarrollo neuronal, quimiotaxis, angiogénesis y respuestas inflamatorias) en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero (por ejemplo un humano) en necesidad de lo mismo, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido como el que se describió arriba.

También, como se describió arriba, la presente invención está dirigida a
20 métodos para el tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de muerte celular incrementada o proliferación celular disminuida, que comprende la administración a un mamífero (tal como un humano) en necesidad del mismo, de una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido como el que se describió arriba.

Además, como se describió arriba, la presente invención se refiere a
25 métodos para el tratamiento o manejo de una enfermedad que resulta de muerte celular disminuida o proliferación celular incrementada, que comprende administrar a un mamífero (por ejemplo un humano) en necesidad del mismo, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo para un péptido como el que se

describió arriba.

Adicionalmente, como se describió arriba, la presente invención se refiere a métodos para tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de la migración o motilidad anormal de células, seleccionada del grupo que consiste de
5 cáncer, restenosis y neuropatía diabética; el método comprendiendo administrar a un mamífero (por ejemplo un humano) en necesidad de lo mismo, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo para un péptido como el que se describió arriba.

La presente invención se refiere además a composiciones para (a)
10 regular respuestas biológicas, (b) tratar o aliviar enfermedades que resultan de muerte celular incrementada o proliferación celular disminuida, (c) tratar o aliviar enfermedades que resultan de muerte celular disminuida o proliferación celular incrementada, o (d) tratar o aliviar enfermedades que resultan de migración o motilidad anormal de células (tales como cáncer, restenosis y neuropatía diabética),
15 que comprenden: (i) una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido como el que se describió arriba, o un anticuerpo para dicho péptido como el que se describió arriba, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también incluye un método para seleccionar agentes o fármacos que reducen o eliminan la actividad de esfingosina cinasa tipo 2,
20 comprendiendo el método detectar una reducción de actividad de la enzima esfingosina cinasa tipo 2 en presencia del agente o fármaco.

Además, la presente invención está dirigida a un método para detectar la presencia de isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra, que comprende:

25 (i) poner en contacto una muestra con anticuerpos que reconocen esfingosina cinasa tipo 2;

(ii) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado entre esfingosina cinasa tipo 2 y anticuerpos específicos para la misma.

La presente invención también se refiere a un método para detectar esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra, que comprende someter la muestra a una reacción en cadena de polimerasa y detectar la presencia de esfingosina cinasa tipo 2.

5 Adicionalmente, la presente invención está dirigida a un equipo diagnóstico para detectar ARN/ADNc de esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra, que comprende iniciadores u oligonucleótidos específicos para ARN o ADNc de esfingosina cinasa tipo 2, adecuados para hibridación con ARN o ADNc de esfingosina cinasa tipo 2 y/o amplificación de secuencias de esfingosina cinasa tipo
10 2; y reactivos auxiliares adecuados.

La esfingosina cinasa cataliza la fosforilación de esfingosina para producir SPP. Basada en la homología de secuencias con esfingosina cinasa 1 murina y humana (SPHK1), que fue recientemente clonada (Kohama, y otros, J. Biol. Chem., 273, 23722-23728, (1998)), la presente invención está dirigida a la clonación,
15 caracterización funcional y distribución en tejido de un segundo tipo de esfingosina cinasa de ratón y humana (mSPHK2 y hSPHK2).

Las mSPHK2 y hSPHK2 de la presente invención codifican proteínas de 617 y 618 aminoácidos, respectivamente, ambas mucho más grandes que SPHK1, y ambas contienen los dominios conservados previamente encontrados en SPHK1,
20 pero sus secuencias difieren considerablemente en los centros y en los extremos amino. El análisis de Northern blot de múltiples tejidos de humano y murino revelaron que la expresión de ARNm de SPHK2 era notablemente diferente de la de SPHK1, y fue mas alta en cerebro, corazón, riñón, testículos e hígado. Mientras que la expresión de SPHK1 es más grande en el día 7 de ratón embriogénico, la
25 expresión de SPHK2 es detectable solamente el día 11 embriogénico y aumenta después.

Células de riñón embriogénico humano 293 transfectadas transitoriamente con vectores de expresión de mSPHK2 o hSPHK1, tenían marcados

aumentos en actividad SPHK, resultando en niveles elevados de SPP. Notablemente, SPHK2 tenía especificidad de sustrato un poco diferente a SPHK1. D-eritro-esfingosina (dihidroesfingosina, DHS) fue un sustrato aún mejor que D-eritro-esfingosina para SPHK2, mientras que DHS fue un potente inhibidor para

5 SPHK1.

SPHK2 también cataliza la fosforilación de fitoesfingosina y D,L-treo-dihidroesfingosina, aunque a un menor grado. DMS, un inhibidor competitivo de SPHK1, fue sorprendentemente un inhibidor no competitivo de SPHK2. Aunque la concentración iónica creciente inhibió SPHK1, KCl y NaCl estimularon notablemente

10 la actividad de SPHK2. Además, Triton X-100 y BSA inhibieron SPHK2, a diferencia de sus efectos sobre SPHK1, mientras que la fosfatidilserina estimuló ambos tipos. Estos datos indican que SPHK2 es un miembro novedoso de esta clase creciente de cinasas de lípido, que es importante en la regulación de diversos procesos biológicos que incluyen mitogénesis, apoptosis, desarrollo neuronal, quimiotaxis, angiogénesis y

15 respuestas inflamatorias.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Con la finalidad de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran

20 características, aspectos y ventajas. Sin embargo, se entiende que la presente invención no está limitada a lo que se representa en los dibujos.

La figura 1A muestra secuencias predichas de aminoácidos de esfingosina cinasa tipo 2 de murino y humano, basadas en alineación non-ClustalW de la secuencias predichas de aminoácidos de "mSPHK2" y esfingosina cinasa 2

25 humana ("hSPHK2"). Sustituciones de aminoácidos idénticas y conservadas están marcadas en oscuro y gris ligero, respectivamente. Los guiones representan espacios en las secuencias y los números a la derecha se refieren a la secuencia de aminoácidos de mSPHK2. Los dominios conservados (C1 a C5) están indicados por

líneas.

La figura 1B es una representación esquemática de regiones conservadas de SPHK1 y SPHK2. La secuencia primaria de mSPHK2 se compara con la de mSPHK1a.

5 Las figuras 2A, 2B y 2C son Northern blots que muestran la expresión específica de tejido de esfingosina cinasa tipo 1 y tipo 2.

En la figura 2A, se marcaron en sus extremos sondas de mSPHK2 (panel superior) y mSPHK1a (panel medio), y se hibridaron con blots de ARN pol(A)+ de los tejidos de ratón indicados, como se describe mas abajo. Carriles: 1, 10 corazón; 2, cerebro; 3, bazo; 4, pulmón; 5, hígado; 6, músculo esquelético; 7, riñón; 8, testículos. Se usó una sonda de β -actina (panel inferior) como un control de carga.

La figura 2B muestra la expresión específica de tejido de hSPHK2. Carriles, 1, cerebro; 2, corazón; 3, músculo esquelético; 4, colon; 5, timo; 6, bazo; 7, 15 riñón; 8, hígado; 9, intestino delgado; 10, placenta; 11, pulmón; 12, leucocito.

La figura 2C se muestra la expresión de mSPHK1a y mSPHK2 durante desarrollo embriogénico de ratón. Blots de ARN Pol(A)+ de los días 7, 11, 15 y 17 de embriones de ratón, se sondearon como en la figura 2A.

Las figuras 3A y 3B son gráficas que muestran la actividad enzimática 20 de SPHK2 recombinante.

En la figura 3A, células HEK293 se transfectaron transitoriamente con un vector vacío o con vectores de expresión de mSPHK2 o hSPHK2. Después de 24 horas, se midió la actividad de SPHK en citosol (barras en blanco) y fracciones particuladas/barras en oscuro). Los datos son medias $\pm$ DE. Células parentales y 25 transfectadas con vector tenían actividades basales de SPHK de 26 y 37 pmol/min/mg, respectivamente.

La figura 3B muestra los cambios en niveles de masa de SPP después de transfección con SPHK2. Se midieron los niveles de masa de SPP en células

HEK293 transfectadas con un vector vacío (barras en blanco) o con mSPHK2 (barras en oscuro) o con hSPHK2 (barras con líneas), como se describe aquí mas adelante. Los datos se expresan como pmol/nmol de fosfolípido.

Las figuras 4A a 4D son gráficas que muestran la especificidad de
5 substrato de mSPHK2.

La figura 4A es una gráfica que muestra fosforilación dependiente de SPHK de varios análogos de esfingosina u otros lípidos (50 mM), que se midió en citosol de células HEK293 transfectadas con mSPHK2. Carriles: 1, D-eritro-esfingosina ("D-eritro-Sph"); 2, D-eritro-dihidroesfingosina ("D-eritro-DHS"); 3, D,L-
10 treo-DHS; 4, N,N-dimetilesfingosina ("DMS"); 5, C2-ceramida; 6, C16-ceramida; 7, diacilglicerol; 8, fosfatidilinositol; 9, fisoesfingosina. Los datos se expresan como porcentaje de fosforilación de D-eritro-Sph.

Las figuras 4A a 4D son gráficas que muestran la inhibición no competitiva de SPHK2 recombinante por N,N-dimetilesfingosina.

15 La figura 4B muestra la inhibición dependiente de la dosis de mSPHK2 por medio de DMS. La actividad de SPHK en lisados celulares de HEK293 después de transfección como en la figura 4^a, se midió con 10 μ M de D-eritro-esfingosina en presencia de concentraciones crecientes de DMS.

20 La figura 4C muestra un análisis cinético de la inhibición de DMS. Se midió la actividad de SPHK con concentraciones variables de D-eritro-esfingosina en ausencia (círculos en blanco) o presencia de 10 μ M de DMS (cuadrados en oscuro) o 20 μ M de DMS (triángulos en oscuro).

La figura 4D son gráficas de Lineweaver-Burk. La K_m para D-eritro-esfingosina fue 3.4 μ M. El valor de K_i para DMS fue 12 μ M.

25 Las figuras a 5A a 5E son gráficas que muestran la dependencia del pH y los efectos de sal sobre mSPHK2.

La figura 5A muestra actividad citosólica de SPHK2 en células HEK293 transfectadas, que se midió en un amortiguador de cinasa con el pH ajustado usando

los siguientes amortiguadores: acetato de sodio 200 mM (pH 4.5-5.5, círculos en blanco); MES 200 mM (pH 6-7, círculos en oscuro); fosfato de potasio 200 mM (pH 6.5-5-8, cuadrados en blanco); HEPES 200 mM (pH 7-7.5, cuadrados en oscuro); Tris-HCl 200 mM (pH 7.5-9, triángulos en blanco); y borato 200 mM (pH 10, triángulo en oscuro).

Las figuras 5B a 5E muestran que las sales estimulan SPHK2, pero inhiben SPHK1.

En las figuras 5B y 5C, la actividad de SPHK en lisados de células HEK293 se midió 24 horas después de transfección con mSPHK1 (figura 5B) o mSPHK2 (figura 5C), en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de NaCl (cuadrados en blanco) o HCl (círculos en oscuro).

La figura 5D muestra un análisis cinético de la activación de SPHK2 por KCl. Se midió la actividad de mSPHK2 con concentraciones variables de D-eritroesfingosina en ausencia (círculos en blanco) o presencia de 50 mM de KCl (cuadrados en blanco), o 200 mM de KCl (cuadrados en oscuro).

La figura 5E son gráficas de Lineweaver-Burk de los datos de la figura 5D. El valor de K_m no fue afectado por la presencia de KCl. Los valores de V_{max} fueron 0.1, 0.3 y 1 (nmol/min/mg) en presencia de 0, 50, y 200 mM de KCl, respectivamente.

Las figuras 6A a 6B son gráficas que muestran que Triton X-100 y seroalbúmina de bovino ("BSA") tienen efectos diferenciales sobre la actividad de SPHK1 y SPHK2. Se transfectaron células HEK293 con mSPHK1a (círculos en blanco) o mSPHK2 (círculos en oscuro), y las actividades de cada uno en lisados celulares se midieron después de 24 horas en presencia de las concentraciones indicadas de Triton X-100 (figura 6A) o BSA (figura 6B).

La figura 6C es una gráfica que muestra que la fosfatidilserina tiene efectos similares sobre la actividad de SPHK1 y SPHK2. Se transfectaron células HEK293 con mSPHK1a (círculos) o mSPHK2 (triángulos), y las actividades de cada

una en los lisados celulares se midió después de 24 horas en presencia de las concentraciones indicadas de fosfatidilserina (símbolos en oscuro) o fosfatidilcolina (símbolos en blanco). Los datos se expresan como porcentaje de actividad de control medida sin ninguna adición.

5

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En una modalidad, la presente invención se refiere a un segmento de ADN o ADNc que codifica isoformas de esfingosina cinasa tipo 2 de mamífero (por ejemplo de ratón y humano)

Además, las moléculas de ácido nucleico aislado de la invención incluyen moléculas de ADN que comprenden secuencias sustancialmente diferentes de las arriba descritas pero que, debido a la degeneración del código genético, codifican todavía isoformas de esfingosina cinasa tipo 2 de mamífero. Desde luego, el código genético y las preferencias de codón específicas de especie son bien conocidos en la técnica. De esta manera, sería de rutina para una persona con conocimientos medios en la materia generar las variantes degeneradas descritas arriba, por ejemplo optimizar la expresión de codón para un hospedero particular (por ejemplo cambiar codones en el ARNm de humano a los preferidos por un hospedero bacteriano tal como *E. coli*).

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en la forma de ARN, tal como ARNm, o en la forma de ADN, que incluye, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente. El ADN puede ser de doble cadena o de una sola cadena. ADN o ARN de una sola cadena puede ser la cadena codificadora, también conocida como la "cadena de sentido", o puede ser la cadena no codificadora, también referida como la "cadena de antisentido".

Por moléculas de ácido nucleico "aislado" se entiende una molécula de

ácido nucleico, ADN o ARN, que ha sido removida de su entorno natural. Por ejemplo, moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector son consideradas aisladas para los fines de la presente invención. Ejemplos adicionales de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospederas, heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcialmente o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen además estas moléculas producidas sintéticamente.

10 La presente invención está dirigida además a moléculas de ácido nucleico que codifican porciones o fragmentos de las secuencias de nucleótidos aquí descritas. Los fragmentos incluyen porciones de las secuencias de nucleótidos de la figura 1 para mSPHK2 y hSPHK2 de por lo menos 10 nucleótidos contiguos de longitud seleccionada de cualquiera de dos enteros, uno de los cuales representa una posición de nucleótido 5' y el segundo de los cuales representa una posición de nucleótido 3', en donde el primer nucleótido para cada secuencia de nucleótidos en la figura 1A es la posición 1. Esto es, cada combinación de una posición de nucleótido 5' y 3' que un fragmento de por lo menos 10 bases de nucleótido contiguas de longitud, o cualquier entero entre 10 y la longitud de una secuencia completa de nucleótidos de mSPHK2 o hSPHK2 de la figura 1A, menos 1.

Además, la presente invención incluyen polinucleótidos que comprenden fragmentos especificados por tamaño, en nucleótidos, en lugar de posiciones de nucleótidos. La presente invención incluye cualquier tamaño de fragmento en nucleótidos contiguos, seleccionado de enteros entre 1 y toda la longitud de una secuencia completa de nucleótidos menos 1. Los tamaños preferidos incluyen 20 a 50 nucleótidos; tamaños de 50 a 300 nucleótidos son útiles como iniciadores y sondas. Las regiones de las cuales pueden derivar secuencias típicas incluyen, sin limitación, por ejemplo regiones que codifican epítopos o

dominios específicos dentro de dicha secuencia, tal como los dominios C1-C5 mostrados en la figura 1A.

En otro aspecto, la invención provee moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de hibridación severas con una secuencia de polinucleótido de la presente invención arriba descrita, por ejemplo una secuencia de ácido nucleico mostrada en la figura 1A o un fragmento especificado de la misma. Por "condiciones de hibridación severas" se entiende incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende: formamida 50%, SSC 5X (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6), solución de Denhardt 5X, sulfato de dextrano 10%, y ADN de espermatozoos de salmón cortado desnaturalizado, 20 µg/ml, seguido por lavado de los filtros en SSC 0.1X a aproximadamente 65 °C.

Las secuencias que codifican los polipéptidos de la presente invención o porciones de los mismos se pueden fusionar con otras secuencias que proveen funciones adicionales conocidas en la técnica, tales como una secuencia marcadora, o una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado, péptidos que tienen determinantes antigénicos conocidos para proveer estimulación de células T colaboradoras, péptidos que codifican sitios para modificaciones posteriores a la traducción, o secuencias de aminoácidos en las cuales se envía la proteína de fusión a una localización deseada, por ejemplo una secuencia guía heteróloga.

La presente invención se refiere además a variantes de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, que codifican porciones, análogos o derivados de los polipéptidos de isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 mostrados en la figura 1A. Las variantes pueden ocurrir naturalmente, tal como una variante alélica natural. Por una "variante alélica" se entiende una de varias formas alternativas de un gen que ocupan un locus dado de un cromosoma de un organismo. Las variantes que no ocurren naturalmente se pueden producir por medio de técnicas de

mutagénesis conocidas. Dichas variantes incluyen las producidas por sustitución de nucleótido, supresión o adición de uno o más nucleótidos en las regiones codificadoras o no codificadoras o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificadoras pueden producir sustituciones conservativas o no conservativas de aminoácidos, supresiones o adiciones. Especialmente preferidas entre estas son las sustituciones silentes, adiciones y supresiones que no alteran las propiedades ni actividades de los polipéptidos de isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 aquí descritos, o porciones de los mismos. También se prefieren a este respecto las sustituciones conservativas.

10 Las moléculas de ácido nucleico por lo menos con 90-99% de identidad con una molécula de ácido nucleico que codifica una isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 mostrada en la figura 1A, es otro aspecto de la presente invención. Estos ácidos nucleicos son incluidos sin considerar si codifican un polipéptido que tiene actividad de esfingosina cinasa. Por "un polipéptido que tiene actividad de esfingosina cinasa tipo 2", se entiende polipéptidos que exhiben actividad similar, pero no idéntica a una actividad de la isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de la presente invención, medida en las pruebas descritas mas abajo. La actividad biológica o función de los polipéptidos de la presente invención se espera que sea similar o idéntica a la de los polipéptidos de otros organismos que comparten un alto grado de identidad estructural/similitud.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a una molécula de ADN recombinante que incluye un vector y una secuencia de ADN como la que se describió arriba. El vector puede tomar la forma de un plásmido, fago, cósmido, YAC, un vector de expresión eucariótico tal como un vector de ADN, *Pichia pastoris*, o un vector de virus tal como por ejemplo vectores de baculovirus, vectores retrovirales o vectores adenovirales, y otros conocidos en la técnica. El gen clonado opcionalmente puede ser colocado bajo el control (esto es, ligado operativamente a) de ciertas secuencias de control tales como secuencias promotoras, o secuencias

que pueden ser inducibles y/o específicas del tipo celular. Los promotores adecuados son conocidos para la persona con conocimientos medios en la materia. La construcción de expresión contendrá además sitios para iniciación de transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para traducción. Entre los vectores preferidos para usar se incluyen pCMV-SPORT2 (Life Technologies, Inc.), pcDNA3 (Invitrogen), por nombrar algunos.

La introducción de la construcción en la célula hospedera se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, electroporación, infección, y otros métodos conocidos en la técnica y descritos en manuales estándar de laboratorio tales como Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. y otros (Eds), Wiley & Sons, Inc. Todos los documentos citados tanto antes como más abajo en la presente, se incorporan en su totalidad como referencia.

En una modalidad adicional, la presente invención se refiere a células hospederas transformadas o transfectadas establemente con las construcciones de ADN recombinante arriba descrito. La célula hospedera puede ser procariótica (por ejemplo bacteriana), eucariótica inferior (por ejemplo de levadura o insecto), o eucariótica superior (por ejemplo todos los mamíferos, incluyendo sin limitación rata y humano).

Se pueden usar células hospederas tanto procarióticas como eucarióticas para la expresión de secuencias codificadoras deseadas, cuando se usan secuencias de control apropiadas que son compatibles con el hospedero designado. Entre los hospederos procarióticos, *E. coli* es usada mas frecuentemente. Secuencias de control de expresión para procarlotes incluyen promotores, que contienen opcionalmente porciones de operador y sitios de unión a ribosoma. Los vectores de transferencia compatibles con hospederos procarióticos son derivados comúnmente, por ejemplo, de pBR322, un plásmido que contiene operones que confieren resistencia a ampicilina y tetraciclina, y los varios vectores pUC, que también contienen secuencias que confieren marcadores de resistencia a

antibiótico. Estos marcadores se pueden usar para obtener transformantes exitosos por selección. Véase por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982) o DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985) para métodos generales de clonación.

- 5 Un transformante que tiene un plásmido en el cual está insertado un ADNc que codifica SPHK2 humana, particularmente *E. coli* pCR3.1-hSPHK2 SANK 70200, se ha depositado en el "Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología", 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón, número de acceso FERM BP-7110,
- 10 depositado el 29 de marzo de 2000.

- La secuencia de ADN puede estar presente en el vector ligado operativamente a una secuencia que codifica una molécula de IgG, un adyuvante, un vehículo o un agente para ayudar a la purificación de SPHK, tal como glutatión-S-transferasa, o una serie de residuos de histidina, también conocidos como una marca
- 15 de histidina. La molécula recombinante puede ser adecuada para transfectar células eucarióticas, por ejemplo células de mamífero y células de levadura en sistemas de cultivo. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* y *Pichia pastoris* son los hospederos de levadura usados mas comúnmente, y son hospederos fúngicos convenientes. Las secuencias de control para vectores de levadura son
- 20 conocidos en la técnica. Están disponibles líneas celulares de mamífero como hospederos para expresión, e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles del American Type Culture Collection (ATCC), tal como las células HEK293 y las células NIH 3T3, por nombrar algunas. También se conocen en la técnica promotores adecuados e incluyen promotores virales tales como los de
- 25 SV40, virus de sarcoma de Rous ("RSV"), adenovirus ("ADV"), virus de papiloma de bovino ("BPV"), y citomegalovirus ("CMV").

Las células de mamífero también pueden requerir secuencias terminadoras y secuencias de adición poli A; también se pueden incluir secuencias

Incrementadoras que incrementan la expresión, y pueden ser convenientes secuencias que ocasionan amplificación del gen. Estas secuencias se conocen en la técnica.

Las células hospederas transformadas o transfectadas se pueden usar
5 como una fuente de secuencias de ADN arriba descritas. Cuando la molécula recombinante toma la forma de un sistema de expresión, las células transformadas o transfectadas se pueden usar como una fuente de la proteína descrita mas abajo.

En otra modalidad, la presente invención se refiere al empleo de secuencias de nucleótido que corresponden al banco GenBank/EMBL Data Bank,
10 números de acceso bankit325787 y bankit325752.

Una secuencia de polipéptido o aminoácido expresada de las secuencias de nucleótidos mencionadas arriba, se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la de un polipéptido codificado de la secuencia, o una porción del mismo, en donde la porción contiene por lo menos de 2
15 a 5 aminoácidos, y muy preferiblemente, por lo menos 8 a 10 aminoácidos, y más preferiblemente por lo menos 15 aminoácidos, o que es inmunológicamente identificable con un polipéptido codificado en la secuencia.

Un polipéptido recombinante o derivado no es necesariamente traducido de una secuencia de ácido nucleico designada; puede ser generado de
20 cualquier manera, incluyendo por ejemplo síntesis química, o expresión de un sistema de expresión recombinante. Además, el polipéptido se puede fusionar a otras proteínas o polipéptidos que incrementan su antigenicidad, tales como adyuvantes, por ejemplo.

Como se indicó arriba, los métodos de la presente invención son
25 adecuados para la producción de cualquier polipéptido de cualquier longitud, mediante inserción de las moléculas de ácido nucleico o vectores arriba descritos en una célula hospedera, y expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés por la célula hospedera. La introducción de las moléculas de

ácido nucleico o vectores en una célula hospedera para producir una célula hospedera transformada, se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Dichos métodos

5 se describen en manuales estándar de laboratorio tales como en Davis y otros, Basic Methods In Molecular Biology, (1986).

Una vez obtenidas las células hospederas transformadas, las células pueden ser cultivadas bajo cualquier condición fisiológicamente compatible de pH y temperatura, en cualquier medio de nutriente adecuado que contiene fuentes

10 asimilables de carbono, nitrógeno y minerales esenciales, que sostienen el crecimiento de la célula hospedera. Las condiciones de cultivo productoras de polipéptido varían de acuerdo al tipo de vector usado para transformar las células hospederas. Por ejemplo, ciertos vectores de expresión comprenden regiones reguladoras que requieren crecimiento celular a ciertas temperaturas, o adición de

15 ciertos agentes químicos o agentes inductores al medio de crecimiento celular, para iniciar la expresión del gen, que resulta en la producción del polipéptido recombinante. De esta manera, el término "condiciones productoras de polipéptido recombinante", como se usa aquí, no significa que estén limitadas a cualquier conjunto de condiciones de cultivo. Los medios y condiciones de cultivo adecuados

20 para las células hospederas y vectores arriba descritos son bien conocidos en la técnica. Después de su producción en las células hospederas, el polipéptido de interés puede ser aislado mediante varias técnicas. Para liberar el polipéptido de interés de las células hospederas, las células son lisadas o rotas. Esta lisis puede ser efectuada poniendo en contacto las células con una solución hipotónica, por

25 tratamiento con una enzima ruptora de la pared celular tal como lisozima, por sonicación, por tratamiento con alta presión, o mediante una combinación de los métodos anteriores. También se pueden usar otros métodos de ruptura y lisis celular que son conocidos para la persona con conocimientos medios en la materia.

Después de la ruptura, el polipéptido se puede separar de los desechos celulares mediante cualquier técnica adecuada para separación de partículas en mezclas de complejo. El polipéptido se puede purificar entonces por medio de técnicas de aislamiento bien conocidas. Las técnicas adecuadas de purificación

5 incluyen, sin limitación, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, electroforesis, inmunoadsorción, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de líquido (LC), cromatografía de líquido de alta

10 resolución (HPLC), cromatografía de líquido de rápida resolución (FPLC), cromatografía con hidroxilapatita y cromatografía con lectina.

Se puede usar proteína recombinante o de fusión como una herramienta diagnóstica y en un método para producir esfingosina-1-fosfato, marcada detectablemente y no marcada, y en un método para medir los niveles de

15 SPP en muestras como se describe abajo. Además, la proteína recombinante se puede usar como un agente terapéutico para reducir la muerte celular y/o aumentar la proliferación celular. Las células hospederas transformadas se pueden usar para

analizar la efectividad de fármacos y agentes que pueden inhibir la función de SPHK2, tal como proteínas de hospedero o agentes derivados químicamente u otras

20 proteínas que pueden interaccionar con la célula para regular negativamente o alterar la expresión de SPHK2, o sus factores.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para las proteínas recombinantes (o polipéptidos) arriba descritas. Por ejemplo, se puede desarrollar un anticuerpo

25 contra un péptido arriba descrito, o contra una porción del mismo de por lo menos 10 aminoácidos, preferiblemente 11 a 15 aminoácidos. Las personas con conocimientos medios en la materia usando metodología estándar pueden desarrollar anticuerpos monoclonales y policlonales para la proteína (o polipéptido)

de la presente invención, o una porción única de la misma. El material y los métodos para producir anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Goding en Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, capítulo 4, 1986).

El nivel de expresión de esfingosina cinasa tipo 2 puede ser detectado a
5 varios niveles. Usando metodología estándar bien conocida en la técnica, se pueden diseñar ensayos para la detección y cuantificación de ARN de esfingosina cinasa tipo 2 e incluyen análisis de hibridación Northern, ensayos de hibridación *in situ* y ensayos de PCR, entre otros. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch y Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (1982) o DNA Cloning, volúmenes I y II (D.
10 N. Glover ed. 1985), o Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. y otros, (Eds), Wiley & Sons, Inc., para una descripción general de métodos para hibridación de ácido nucleico.

Se pueden diseñar sondas de polinucleótido para la detección de ARN de esfingosina cinasa tipo 2 de la secuencia disponible en los números de acceso
15 AF068748 y/o AF068749 para la secuencia de ratón (Kohama, T. y otros, J. Biol. Chem., 273:23722-23728). Por ejemplo, se puede recubrir una superficie tal como una membrana de nitrocelulosa con ARN aislado de muestras, y prepararse para hibridación Northern. En el caso de hibridación *in situ* de muestras de biopsia, por ejemplo, la muestra de tejido se puede preparar para hibridación mediante métodos
20 estándares conocidos en la técnica, e hibridar con secuencias de polinucleótido que reconocen específicamente ARN de esfingosina cinasa tipo 2. La presencia de un híbrido formado entre el ARN de la muestra y el polinucleótido se puede detectar por medio de cualquier método conocido en la técnica, tal como radioquímica o inmunoquímica, por nombrar algunos.

25 Un experto en la materia puede encontrar conveniente preparar sondas que son bastante largas y/o que abarcan regiones de la secuencia de aminoácidos que tendrían un alto grado de redundancia en las secuencias correspondientes de ácido nucleico. En otros casos, puede ser conveniente usar simultáneamente dos

series de sondas, cada una para una región diferente del gen. Aunque la longitud exacta de cualquier sonda empleada no es crítica, las secuencias de sonda típicas no son mayores de 500 nucleótidos, más regularmente no son mayores de 250 nucleótidos; pueden ser no mayores de 100 nucleótidos, y también pueden ser no mayores de 75 nucleótidos de longitud. Pueden ser necesarias secuencias de sonda más grandes para abarcar regiones de polinucleótido únicas con diferencias suficientes para permitir la distinción de secuencias objetivo relacionadas. Por esta razón, las sondas son de preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, y muy preferiblemente de alrededor de 20 a alrededor de 50 nucleótidos.

La secuencia de ADN de esfingosina cinasa tipo 2 se puede usar para diseñar iniciadores para usar en la detección de esfingosina cinasa tipo 2, usando la reacción de cadena de polimerasa (PCR) o PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Los iniciadores se pueden unir específicamente al ADNc de esfingosina cinasa tipo 2 producido por transcripción inversa de ARN de esfingosina cinasa tipo 2, con la finalidad de detectar la presencia, ausencia o cuantificar la cantidad de esfingosina cinasa tipo 2 por comparación con un estándar. Los iniciadores pueden ser de cualquier longitud que varía de 7 a 40 nucleótidos, preferiblemente 10 a 35 nucleótidos, de preferencia 18 a 25 nucleótidos, homólogos o complementarios a una región de la secuencia de esfingosina cinasa tipo 2.

Los reactivos y controles necesarios para las reacciones de PCR o RT-PCR, son bien conocidos en la técnica. Los productos amplificados se pueden analizar entonces para detectar la presencia o ausencia de secuencias de esfingosina cinasa tipo 2, por ejemplo mediante fraccionación en gel, radioquímica y técnicas Inmunoquímicas. Este método es ventajoso, ya que requiere un pequeño número de células. Una vez que es detectada esfingosina cinasa tipo 2, se puede hacer una determinación de si la célula está sobreexpresando o subexpresando esfingosina cinasa tipo 2 por comparación con los resultados obtenidos de una célula

normal usando el mismo método. Los incrementos del nivel de ARN de esfingosina cinasa tipo 2 se correlacionan con un incremento en la proliferación celular y una reducción de la muerte celular.

En otra modalidad, la presente invención se refiere a un equipo diagnóstico para la detección de ARN de esfingosina cinasa tipo 2 en células. El equipo comprende un paquete unitario que tiene uno o más recipientes de oligonucleótidos iniciadores de esfingosina cinasa tipo 2 para la detección de esfingosina cinasa tipo 2 por medio de PCR o RT-PCR, o polinucleótidos de esfingosina cinasa tipo 2 para la detección de ARN de esfingosina cinasa tipo 2 en células, por hibridación *in situ* o análisis Northern, y en algunos equipos incluyendo recipientes de varios reactivos usados para el método deseado. El equipo también puede contener uno o más de los siguientes artículos: enzimas de polimerización, amortiguadores, instrucciones, controles, marcas de detección. Los equipos pueden incluir recipientes de reactivos combinados en proporciones adecuadas para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la invención. Los recipientes de reactivos contienen preferiblemente reactivos en cantidades unitarias que eliminan pasos de medición cuando se realizan los presentes métodos.

En una modalidad adicional, la presente invención provee un método para identificar y cuantificar el nivel de esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra biológica particular. Con este propósito, se puede usar cualquiera de una variedad de métodos que son capaces de identificar (o cuantificar) el nivel de esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra.

Los ensayos diagnósticos para detectar esfingosina cinasa tipo 2 pueden comprender biopsia o ensayo *in situ* de células de un órgano o secciones de tejido, así como también un aspirado de células de un tejido de tumor o normal. Además, se pueden realizar ensayos en extractos celulares de órganos, tejidos, células, orina, o suero o sangre, o cualquier otro fluido o extracto corporal.

Cuando se analiza una biopsia, el ensayo comprenderá poner en

contacto la muestra por ensayar con un ligando de esfingosina cinasa tipo 2, natural o sintético, o un anticuerpo, policlinal o monoclonal, que reconoce esfingosina cinasa tipo 2, o un antisuero capaz de detectar esfingosina cinasa tipo 2, y detectar el complejo formado entre esfingosina cinasa tipo 2 presente en la muestra y el ligando o anticuerpo de esfingosina cinasa tipo 2 añadido.

Los ligandos o substratos de esfingosina cinasa tipo 2 incluyen por ejemplo, esfingosina, además de las clases naturales y sintéticas de ligandos y sus derivados, que pueden derivar de fuentes naturales como animales o extractos de plantas. Otros ligandos de esfingosina cinasa tipo 2 incluyen calmodulina.

10 Los ligandos de esfingosina cinasa tipo 2 o anticuerpos anti-esfingosina cinasa tipo 2, o fragmentos de ligando y anticuerpos capaces de detectar esfingosina cinasa tipo 2, se pueden marcar usando cualquiera de una variedad de marcas y métodos de marcación para usar en diagnosis y prognosis de la enfermedad asociada con proliferación celular incrementada, tal como cáncer, o muerte celular reducida. Ejemplos de tipos de marcas que se pueden usar en la presente invención incluyen, sin limitación, marcas de enzima, marcas radioisotópicas, marcas isotópicas no radioactivas, y marcas quimioluminiscentes.

Ejemplos de marcas de enzima adecuadas incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerol-fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, acetilcolina esterasa, etc.

25 Ejemplos de marcas radiolabeladas adecuadas incluyen ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{21}Cl , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{11}C , ^{18}F y ^{131}I .

Ejemplos de marcas isotópicas no radioactivas incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr y ^{48}Fe .

Ejemplos de marcas fluorescentes adecuadas incluyen una marca de

^{152}Eu , una marca de fluoresceína, una marca de isotiocianato I, una marca de rodamina, una marca de ficoeritrina, una marca de ficocianina, una marca de aloficocianina y una marca de fluorescamina.

Ejemplos de marcas quimioluminiscentes incluyen una marca luminal, una marca lsoluminal, una marca de éster aromático de acridinio, una marca de imidazol, una marca de sal de acridinio, una marca de éster de oxalato, una marca de luciferina y una marca de luciferasa.

Las personas con conocimientos medios en la materia conocerán otras marcas adecuadas que se pueden emplear con la presente invención. La unión de estas marcas a ligandos y a anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede efectuar usando técnicas estándar conocidas comúnmente para los expertos en la materia. Las técnicas típicas son descritas por Kennedy J. H. y otros, (1976), Clin. Chem. Acta., 70, 1-31, y Schurs, A. H. W. M. y otros, (1977), Clin. Chem. Acta., 81, 1-40. Las técnicas de acoplamiento mencionadas al último son el método de glutaraldehído, el método de peryodato, el método de dalemida, y otros.

La detección de los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpos) de la presente invención se puede mejorar mediante el uso de vehículos. Vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. Para los fines de la presente invención, la naturaleza del vehículo puede ser soluble en algún grado o insoluble. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible, siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a esfingosina cinasa tipo 2. De esta manera, la configuración del soporte puede ser esférica, como en un glóbulo, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana, tal como una hoja o una tira de prueba. Los expertos en la materia conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo monoclonal, o serán capaces de determinar los mismos usando experimentación

rutina.

Los ligandos o anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo o ligando de esfingosina cinasa tipo 2 arriba mencionados, se pueden usar para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de esfingosina cinasa tipo 2. Dicha

5 detección se puede efectuar usando cualquiera de una variedad de inmunoensayos conocidos para las personas expertas en la materia, tales como radioinmunoensayos, ensayos inmunométricos, etc. Usando metodología estándar bien conocida en la técnica, se puede construir un ensayo diagnóstico recubriendo una superficie (esto es, un soporte sólido), por ejemplo una placa de microtitulación o

10 una membrana (por ejemplo una membrana de nitrocelulosa), con anticuerpos específicos para esfingosina cinasa tipo 2 o una porción de esfingosina cinasa tipo 2, y ponerla en contacto con una muestra de una persona que se sospecha tiene una enfermedad relacionada con esfingosina cinasa tipo 2. Se puede detectar la presencia de un complejo resultante formado entre esfingosina cinasa tipo 2 en la

15 muestra y anticuerpos específicos para la misma, por medio de cualquier método de detección conocido en la técnica, tal como espectroscopía o colorimetría de anticuerpo fluorescente. Una buena descripción de un radioinmunoensayo se puede encontrar en Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology by Work, T.S. y, North Holland Publishing Company, N.Y. (1978), incorporado aquí como

20 referencia. Los ensayos de sándwich los describe Wide en las páginas 199-206 de Radioimmune Assay Method, editado por Kirkham and Hunter, E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970.

Los métodos diagnósticos de esta invención son predictivos de la proliferación y potencial metastásico en pacientes que sufren de cánceres, incluyendo carcinoma de

25 pulmón, tal como carcinoma de célula pequeña, carcinoma de célula grande, carcinoma escamoso y adenocarcinoma, carcinoma de estómago, adenocarcinoma prostático, carcinoma ovárico tal como cistadenocarcinoma seroso y cistadenocarcinoma mucinoso, tumores de célula germinal ovárica, carcinomas

testiculares y tumores de células germinales, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma biliar, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de célula renal, carcinoma endometrial, incluyendo adenocarcinomas y tumores Mullerianos mixtos (carcinosarcomas), carcinomas del endocérvix, ectocérvix y vagina, tal como

5 adenocarcinoma y carcinoma escamoso, carcinoma de célula basal, melanoma y tumores accesorios de la piel, carcinoma esofágico, carcinomas de la nasofaringe y orofaringe incluyendo carcinoma escamoso y adenocarcinomas, carcinomas de glándula salival, tumores de cerebro y sistema nervioso central, incluyendo tumores de origen glial, neuronal y meningeal, tumores de nervio periférico, sarcomas de

10 tejido blando y sarcomas de hueso y cartilago. Las células de estos tumores, que expresan niveles incrementados de ARN de esfingosina cinasa tipo 2 o proteína esfingosina cinasa tipo 2, tienen proliferación incrementada y muerte celular disminuida.

La proteína se puede usar para identificar Inhibidores de la actividad de

15 esfingosina cinasa tipo 2. Usando un ensayo de enzima, se pueden descubrir agentes naturales y sintéticos que produzcan una reducción o eliminación de la actividad enzimática de esfingosina cinasa tipo 2. No es necesario conocer el mecanismo de acción del Inhibidor, en tanto se detecte una reducción de la actividad de esfingosina cinasa tipo 2. Los Inhibidores pueden incluir agentes o fármacos que

20 se unan o secuestren el sustrato o sustratos de la enzima o sus cofactores, o inhiban por si solos la enzima directamente, por ejemplo por unión irreversible del agente o fármaco a la enzima, o indirectamente, por ejemplo, por introducción de un agente que se une al sustrato de esfingosina cinasa tipo 2. Los agentes o fármacos relacionados con la presente invención pueden resultar en inhibición parcial o

25 completa de la actividad de esfingosina cinasa tipo 2.

Los inhibidores de esfingosina cinasa tipo 2 incluyen DL-treo-dihidroesfingosina (DHS) y el Inhibidor descubierto más recientemente, N,N-dimetilesfingosina ("MS") descrita por Edsall, L. C. y otros, (1998), Biochemistry, 37,

12892-12898. Los inhibidores de esfingosina cinasa tipo 2 se pueden usar en el tratamiento o alivio de enfermedades tales como cáncer, aterosclerosis, trastornos neurodegenerativos, esto es, apoplejía y enfermedad de Alzheimer.

Los agentes que reducen el nivel de esfingosina cinasa tipo 2 (esto es, en un humano o un animal) o reducen o inhiben la actividad de esfingosina cinasa tipo 2, se pueden usar en la terapia de cualquier enfermedad asociada con los niveles elevados de esfingosina cinasa tipo 2 o enfermedades asociadas con proliferación celular incrementada, tal como cáncer. Un incremento en el nivel de esfingosina cinasa tipo 2 es determinado cuando el nivel de esfingosina cinasa tipo 2 en una célula de tumor es aproximadamente 2 a 3 veces el nivel de esfingosina cinasa tipo 2 en la célula normal, hasta aproximadamente 10 a 100 veces la cantidad de esfingosina cinasa tipo 2 en una célula normal. Los agentes que reducen ARN de esfingosina cinasa tipo 2 incluyen, sin limitación, uno o más ribozimas capaces de digerir ARN de esfingosina cinasa tipo 2, u oligonucleótidos de antisentido capaces de hibridar con ARN de esfingosina cinasa tipo 2, de modo que la traducción de esfingosina cinasa tipo 2 es inhibida o reducida, dando como resultado una reducción del nivel de esfingosina cinasa tipo 2. Estos oligonucleótidos de antisentido se pueden administrar como ADN, como ADN atrapado en proteoliposomas que contienen proteínas de receptor de envoltura viral (Kanoda, Y. y otros, (1989), Science, 5, 243, 375), o como parte de un vector que puede ser expresado en la célula objetivo de modo que se hace el ADN o ARN de antisentido. Se conocen en la técnica vectores que son expresados en tipos particulares de células, por ejemplo, para la glándula mamaria. Véase Furth, J. Mammary Gland Biol. Neopl., 2, (1997), 373, para ejemplos de control condicional de expresión de genes en la glándula mamaria.

Alternativamente, el ADN se puede inyectar junto con un vehículo. Un vehículo puede ser una proteína tal como una citocina, por ejemplo interleucina o un vehículo de polilisina-glicoproteína. Dichas proteínas de vehículo y vectores y

métodos de uso de los mismos son conocidos en la técnica. Además, con el ADN se podrían recubrir glóbulos delgados de oro y dichos glóbulos se pueden introducir en la piel, por ejemplo con una pistola de genes (Ulmer, T. B. y otros, Science, 259, (1993), 1745).

- 5 Alternativamente, se pueden proveer anticuerpos o compuestos capaces de reducir o inhibir esfingosina cinasa tipo 2, esto es reduciendo o inhibiendo la expresión, producción o actividad de esfingosina cinasa tipo 2, tal como antagonistas, como una proteína aislada y sustancialmente purificada, o como parte de un vector de expresión capaz de ser expresado en la célula blanco, de modo que
- 10 es producido el agente reductor o inhibidor de esfingosina cinasa tipo 2. Además, se pueden administrar cofactores tales como varios iones, esto es, Ca^{2+} , o factores que afectan la estabilidad de la enzima, para modular la expresión y función de esfingosina cinasa tipo 2. Estas formulaciones se pueden administrar mediante vías normales. En general, las combinaciones se pueden administrar por vía tópica,
- 15 transdérmica, intraperitoneal, oral, rectal, o parenteral (por ejemplo intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, los compuestos inhibidores de esfingosina cinasa tipo 2 se pueden incorporar en polímeros biodegradables que se implantan en la cercanía de donde se desea la liberación del fármaco, por ejemplo, en el sitio de un tumor, de modo que el compuesto inhibidor de esfingosina cinasa tipo 2 sea
- 20 liberado lentamente a todo el cuerpo. Los polímeros biodegradables y su uso, por ejemplo, los describen en detalle Brem y otros, J. Neurosurg., 74, (1991), 441-446. Estos compuestos están destinados a ser provistos a sujetos receptores en una cantidad suficiente para efectuar la inhibición de esfingosina cinasa tipo 2. Similarmente, los agentes que son capaces de afectar negativamente la expresión,
- 25 producción, estabilidad o función de esfingosina cinasa tipo 2, están destinados para ser provistos a sujetos receptores en una cantidad suficiente para efectuar la inhibición de esfingosina cinasa tipo 2. Se dice que una cantidad es suficiente para "efectuar" la inhibición o inducción de esfingosina cinasa tipo 2, si la dosificación, vía

de administración, etc., del agente, son suficientes para afectar dicha respuesta.

De acuerdo con la función de esfingosina cinasa tipo 2 en la proliferación celular, los agentes que estimulan el nivel de esfingosina cinasa tipo 2, tales como agonistas de SPHK2, se pueden usar en la terapia de cualquier enfermedad asociada con una reducción de SPHK2, o una disminución de la proliferación celular, en donde SPHK2 es capaz de aumentar dicha proliferación, por ejemplo, retardo del desarrollo.

Al proveer agentes que modulan la expresión o función de esfingosina cinasa tipo 2 a un paciente receptor, la dosificación del agente administrado ha de variar dependiendo de factores tales como la edad, peso, estatura, sexo, condición médica general, historia médica previa del paciente, etc. En general, es conveniente proveer al receptor con una dosificación de agente que está en la escala de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (peso corporal del paciente), aunque también se pueden administrar dosis más bajas o más altas.

Se dice que una composición es "farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. Se dice que dicho agente se administra en una "cantidad terapéuticamente efectiva", si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia resulta en un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Los compuestos de la presente invención se pueden formular de acuerdo con los métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en donde estos materiales o sus derivados funcionales se combinan en mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados y su formulación, inclusive de otras proteínas humanas, por ejemplo seroalbúmina humana, se describen por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a Ed., Osol, A. ed., Mack Easton PA. (1980). Para formar una composición farmacéuticamente aceptable para administración efectiva, dicha composición contendrá una cantidad efectiva de los compuestos arriba descritos

junto con una cantidad adecuada del vehículo portador.

Se pueden emplear métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de acción. Se pueden obtener preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para formar complejos o absorber los compuestos. La liberación controlada se puede realizar seleccionando las macromoléculas (por ejemplo poliésteres, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, vinilacetato de etileno, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) y la concentración de macromoléculas apropiadas, así como también el método de incorporación para controlar la liberación. Otro método posible para controlar la duración de acción

mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar los compuestos de la presente invención en partículas de un material polimérico, tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de vinilacetato de etileno. Alternativamente, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa para microcápsulas de gelatina y poli(metacrilato de metilo)microcápsulas, respectivamente, o en sistemas coloidales de suministro de fármaco, por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas, o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

La presente invención también provee equipos para usar en los métodos diagnósticos o terapéuticos arriba descritos. Los equipos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender uno o más recipientes tales como frascos, tubos, ampollitas, botellas y similares, que pueden comprender una o más de las composiciones de la invención.

Los equipos de la presente invención pueden comprender uno o más compuestos o composiciones de la presente invención, y uno o más excipientes, diluyentes o adyuvantes.

Habiendo descrito en detalle la presente invención, la misma será entendida más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen aquí solo con fines ilustrativos y no se consideran limitativos de la presente invención.

5 Se usaron los siguientes materiales y métodos en los ejemplos abajo descritos.

EJEMPLOS

10 Materiales

SPP, esfingosina y N,N-dimetilesfingosina eran de Biomol Research Laboratory Inc. (Plymouth Meeting, PA). Todos los otros lípidos se compraron a Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). Se compró [g-32P]ATP (3000 Ci/mmol) a Amersham (Arlington Heights, IL). Se obtuvieron poli-L-lisina y colágeno de 15 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Se obtuvieron enzimas de restricción de New England Biolabs (Beverly, MA). Se compraron blots de ARN poli(A)+ de tejidos múltiples de ratón adulto, a Clontech (Palo Alto, CA). Se obtuvo "Lipofectamine PLUS" y "Lipofectamine" de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD).

20 EJEMPLO 1

Clonación de ADNc de esfingosina cinasa tipo 2 de murino (mSPHK2)

Búsquedas BLAST de la base de datos EST identificaron una clona EST de ratón (número de acceso Genbank AA839233) que tenía homología 25 significativa con dominios conservados de mSPHK1a (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23721-23728), no obstante tenía diferencias sustanciales de secuencia. Usando este EST, se clonó una segunda isoforma de SPHK, denotada como mSPHK2, por

medio de dos diferentes enfoques de PCR.

En el primer enfoque se usó el método de clonación de PCR de una genoteca de ADNc de ratón (Stratagene). Se sembraron en placa aproximadamente 1×10^6 fagos en veinte placas de 150 mm; las placas se recogieron y se aislaron plásmidos usando procedimientos estándar (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. y Struhl, K., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley-Interscience, New York (1987)). Se llevó a cabo una reacción inicial de PCR con una secuencia iniciadora específica (M-3-1, 5'-CCTGGGTGCACCTGCGCCTGTATTGG (SEQ ID NO: 1)) y el iniciador inverso M13. Los productos más grandes de PCR se purificaron en gel y se usaron como molde para una segunda PCR que contenía una secuencia iniciadora de antisentido específica (M-3-2, 5'-CCAGTCTTGGGGCAGTGGAGAGCC-3' (SEQ ID NO:2)) y el iniciador T3. Los productos finales de PCR se subclonaron usando un equipo de clonación "TOPO TA" (Invitrogen) y después se secuenciaron. Se usó ADN polimerasa de alta fidelidad de platino (Life Technologies) para las amplificaciones de PCR con los siguientes parámetros de ciclización: 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos, y 70°C durante 2 minutos, con una extensión final de iniciador a 72°C durante 5 minutos.

En un segundo enfoque, se realizó PCR de 5'RACE con el sistema 5'RACE para amplificación rápida de extremos de ADNc de acuerdo con el protocolo del fabricante (Life Technologies). Se aisló ARN Poli(A)+ de fibroblastos Swiss 3T3 usando un equipo de purificación de ARNm Quick Prep (Pharmacia). La primera cadena de ADNc se sintetizó a 42°C durante 50 minutos con 5 mg de ARN poli(A)+ 3T3 usando un iniciador de antisentido diseñado de la secuencia de AA839233 (m-GSP1, 5'-AGGTAGAGGCTTCTGG (SEQ ID NO:3)) y transcriptasa inversa SuperScript II (Life Technologies). Se llevaron a cabo dos reacciones consecutivas de PCR usando este ADNc como molde y Taq polimerasa LA (TaKaRa), de la siguiente manera: primera PCR, 94°C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de

94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos, y extensión de iniciador a 72°C durante 5 minutos con Iniciador Ancla Abreviado [Abridged Anchor Prime] 5'RACE, 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIG (SEQ ID NO:4) y el iniciador de antisentido específico de objetivo m-GSP2, 5'-GCGATGGGTGAAAGCTGAGCTG (SEQ ID NO:5); para la segunda PCR se emplearon las mismas condiciones, pero la temperatura de apareamiento fue de 65°C, con Iniciador de Amplificación Universal Abreviado [Abridged Universal Amplification Primer] (AUAP), 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC (SEQ ID NO:6) y m-GSP3, 5'-AGTCTCCAGTCAGCTCTGGACC (SEQ ID NO:7). Los productos de PCR se subclonaron en vectores de expresión pCR3.1 y pcDNA 3.

EJEMPLO 2

Clonación de ADNc de esfingosina cinasa 2 de humano (hSPHK2)

Se usó ARN poli(A)+ de células HEK293 para una reacción 5'RACE. Se diseñaron iniciadores de antisentido específicos (h-GSP1, 5'-CCCACTCACTCAGGCT (SEQ ID NO:8); h-GSP2, 5'-GAAGGACAGCCCAGCTTCAGAG (SEQ ID NO:9); y h-GSP3, 5'-ATTGACCAATAGAAGCAACC (SEQ ID NO:10)) de acuerdo con la secuencia de una clona EST humana (número de acceso AA295570). Se sintetizó una primera cadena de ADNc con 5 µg de ARNm de HEK293 y h-GSP1. Este ADNc se usó como un molde en una reacción de PCR inicial usando iniciador Abridged Anchor Primer 5'RACE y h-GSP2. Después, se llevó a cabo una PCR anidada usando el iniciador AUAP y h-GSP3. Los productos resultantes de PCR se clonaron y secuenciaron como se describió arriba.

EJEMPLO 3

Sobreexpresión y actividad de SPHK2

Se cultivaron células de riñón embrionario humano (HEK293, ATCC CRL-1573) y fibroblastos NIH 3T3 (ATCC CRL-1658), como lo describen Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S. y Spiegel, S., J. Cell Biol., 147, (1999), 545-558. Se sembraron células HEK293 a 6×10^5 por pozo en placas de 6 pozos recubiertas con poli-L-lisina. Después de 24 horas, las células se transfectaron con 1 μ g de vector solo, o con vectores que contienen construcciones de esfingosina cinasa y 6 μ l de reactivo "Lipofectamine PLUS" más 4 μ l de reactivo "Lipofectamine" por pozo. De uno a tres días después de la transfección, las células se cosecharon y se lisaron por congelación-descongelación como lo describen Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998), 23722-23728. En algunos experimentos, se fraccionaron lisados celulares en citosol y fracciones de membrana por centrifugación a $100,000 \times g$ durante 60 minutos. Se determinó la actividad SPHK en presencia de esfingosina, preparada como un complejo con BSA, 4 mg/ml, y [γ - ^{32} P]ATP en amortiguador de cinasa (Olivera, A. y Spiegel, S. en Methods in Molecular Biology, (Bird, I.M. ed.), (1998), Vol. 105, 233-242, Humana Press, Inc., Totowa, N.J.), conteniendo KCl 200 mM, a menos que se indique de otra manera. Se separó ^{32} P-SPP por medio de TLC y se cuantificó con un aparato Phosphoimager como se describió previamente.

20

EJEMPLO 4

Extracción de lípido y medición de SPP

Las células se lavaron con PBS y se rasparon en 1 ml de metanol conteniendo 2.5 μ l de HCl concentrado. Los lípidos se extrajeron agregando 2 ml de cloroformo/NaCl 1M (1:1, v/v) y 100 μ l de NaOH 3N, y las fases se separaron. La fase acuosa básica que contenía SPP, y carecía de esfingosina, ceramida y la mayoría de los fosfolípidos, se transfirió a un tubo de vidrio siliconizado. La fase

25

orgánica se volvió a extraer con 1 ml de metanol/NaCl 1M (1:1, v/v) más 50 µl de NaOH 3N, y se combinaron las fracciones acuosas. Se midió la masa sobre SPP en la fase acuosa y fosfolípidos totales en la fase orgánica, exactamente como lo describen Edsall, L. C., Pirianov, G. G. y Spiegel, S., J. Neurosci., **17**, (1997) 6952-6960; Edsall, L. C. y Spiegel, S., Anal. Biochem., **272**, (1999) 80-86).

EJEMPLO 5

Análisis Northern blotting

10 Se compraron de Clontech, blots de ARN poli(A)+ conteniendo 2 µg de ARN poli(A)+ por carril, de múltiples tejidos de ratón y humano adulto, y embriones de ratón. Se hibridaron blots con el fragmento PST1 de 1.2 kb de AST AA389187 de ratón (sonda mSPHK1), el fragmento EcoRI de 1.5 kb de pCR3.1-mSPHK2, o el
15 fragmento PVull de 0.3 kb de pCR3.1-hSPHK1, después de purificación en gel y marcación con [α -³²P]dCTP. Se llevó a cabo hibridación en amortiguador "ExpressHyb" (Clontech), a 65°C durante la noche, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los blots se volvieron a sondear con b-actina como un control de carga (Clontech). Se cuantificaron las bandas usando un Molecular Dynamics
20 Phosphoimager.

Resultados

Clonación de esfingosina cinasa tipo 2:

Las búsquedas Blast de la base de datos EST identificó varios ESTs que exhibieron homología significativa con la secuencia mSPHK1a recién clonada.
25 Se diseñaron iniciadores específicos de las secuencias de estos ESTs y se usaron para clonar un nuevo tipo de esfingosina cinasa de ratón y humano (denominado mSPHK2 y hSPHK2), mediante enfoques de clonación de PCR de una genoteca de ADNc de cerebro de ratón y PCR 5'-RACE.

En la figura 1A se muestra la alineación ClustalW de las secuencias de aminoácidos de mSPHK2 y hSPHK2. Los marcos de lectura abiertos de mSPHK2 y hSPHK2 codifican polipéptidos de 617 y 618 aminoácidos, respectivamente, con 83% de identidad y 90% de similitud. También están presentes cinco regiones altamente conservadas (C1 a C5), identificadas previamente en SPHK1s (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998) 23722-23728) en las dos cinasas de tipo 2. De manera interesante, el motivo invariante GGKGK cargado positivamente en el dominio C1 de SPHK1, es modificado a GGRGL en SPHK2, sugiriendo que puede no ser parte del sitio de unión de ATP como se propuso previamente (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998) 23722-23728). Una búsqueda de motivo también reveló que una región que empieza justo antes de los dominios C1 conservados de mSPHK2 y hSPHK2 (aminoácidos 147 a 284), también tenía homología con el sitio catalítico de diacilglicerol cinasa.

En comparación con SPHK1, ambos SPHK2s codifican proteínas mucho más grandes que contienen 236 aminoácidos adicionales (figura 1B). Más aún, sus secuencias difieren considerablemente de SPHK1 en el centro y en los extremos amino. Sin embargo, después del aminoácido 140 de mSPHK2, las secuencias de SPHK de tipo 1 y de tipo 2 tienen un alto grado de similitud. Estas secuencias (aminoácidos 9 a 226 de mSPHK1; 141 a 360 para mSPHK2), que abarcan los dominios C1 a C4, tienen 47% de identidad y 79% de similitud (figura 1B). En la porción C terminal de las proteínas, también hay regiones homólogas grandes, que incluyen el dominio C5, del aminoácido 227 al 381 para mSPHK1 y 480 a 617 para mSPHK2, con 43% de identidad y 78% de similitud (figura 1B). La divergencia en estos dominios sugiere que probablemente SPHK2 no se origina como un simple evento de duplicación de gen.

Distribución en tejido de esfingosina cinasa tipo 2

Se comparó la distribución en tejido de la expresión de ARNm de SPHK2 en ratón adulto con la de SPHK1, por medio de Northern blotting (figura 2A). En la mayoría de los tejidos, incluyendo hígado, corazón, riñón, testículos y cerebro de adulto, se detectó una especie predominante de ARNm de SPHK2 de 3.1 kb, indicando expresión ubicua. Sin embargo, el nivel de expresión fue notablemente variable y fue más alto en hígado y corazón de adulto y escasamente detectable en músculo esquelético y bazo (figura 2A). En contraste, el patrón de expresión de mSPHK1 fue muy diferente, con la expresión de ARNm más alta en pulmón, bazo e hígado de adulto, aunque la expresión en el hígado no predomina como con mSPHK2. Tanto mSPHK1 como mSPHK2 fueron expresados temporalmente y diferencialmente durante desarrollo embrionario. El mSPHK1 fue altamente expresado en embrión de ratón el día 7 (E7) y disminuyó dramáticamente después de E11 (figura 2B). En contraste, en E7, la expresión de mSPHK2 fue mucho más baja que la de mSPHK1, y aumentó gradualmente hasta E17. El ARNm del transcrito de 2.8 kb de hSPHK2 fue expresado principalmente en riñón, hígado y cerebro de adulto, con expresión mucho más baja en otros tejidos (figura 2C). De manera interesante, la expresión de SPHK2 en riñón humano fue muy alta y relativamente mucho más baja en el ratón, mientras que se mantuvo el patrón opuesto para el hígado.

20

Actividad de esfingosina cinasa tipo 2 recombinante

Para investigar si mSPHK2 y hSPHK2 codifican confiablemente SPHKs, se transfectaron transitoriamente células HEK293 con vectores de expresión que contenían los ADNcs correspondientes. Como estudios previos indicaron que SPHK podría estar presente en las células, tanto en formas solubles como asociadas a membrana (Olivera, A. y Spiegel, S., Nature, **365**, (1993) 557-560; Banno, Y., Kato, M., Hara, A. y Nozawa, Y., Biochem. J., **335**, (1998) 301-304; Buehrer, B. M. y Bell, R. M., J. Biol. Chem., **267**, 3154-3159; Olivera, A. Rosenthal, J. y Spiegel, S., Anal.

25

Biochem., 223, (1994) 306-312; Ghosh, T. K., Blan, J. y Gill, D. L., J. Biol. Chem., 269, (1994), 22628-22635), se midió la actividad de SPHK2 recombinante tanto en citosol como en fracciones de membrana de células transfectadas. Como lo describieron previamente Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728, células HEK 293 no tratadas o transfectadas con vector tienen bajos niveles de actividad SPHK (figura 3A). Veinticuatro horas después de la transfección con mSPHK2 y hSPHK2, aumentó la actividad de SPHK *in vitro* en 20 y 35 veces, respectivamente, y posteriormente disminuyó (figura 3 A). En contraste, la actividad de SPHK de células transfectadas con mSPHK1 fue mucho más alta, 610 veces más que los niveles basales 24 horas después de la transfección, y permanece a este nivel durante al menos 3 días más (datos no mostrados). Como en las células HEK293, la transfección de fibroblastos NIH 3T3 con mSPHK1, resultó en una actividad SPHK mucho más alta que con mSPHK2. Previamente se encontró que, de manera similar a las células no transfectadas, la mayor parte de la actividad SPHK en células transfectadas con mSPHK1 fue citosólica (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728). Similamente, en células transfectadas con mSPHK2 o hSPHK2, 17% y 26%, respectivamente, de la actividad SPHK estuvo asociada a la membrana (figura 3B), aunque gráficas de hidropatía Kyte-Doolittle no sugieren la presencia de dominios que atraviesan la membrana hidrofóbica.

La transfección de células HEK 293 con mSPHK2 y hSPHK2 también resultó en aumentos de 2.2 y 3.3 veces en SPP, el producto formado por SPHK, respectivamente (figura 3C), lo que estuvo en concordancia con estudios previos de niveles de metabolito esfingolípido después de transfecciones con mSPHK1a, mostrando una falta de correlación de veces de incremento y actividad enzimática *in vitro* (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., 273, (1998) 23722-23728; Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L. C., Nava,

V., Cuvillier, O., Poulton, S. y Spiegel, S., J. Cell Biol., **147**, (1999), 545-558).

Características de mSPHK2 recombinante

Especificidad de sustrato

Aunque SPHK2 es altamente homóloga a SPHK1, hay diferencias
 5 sustanciales de secuencia. Por lo tanto, era de interés comparar sus propiedades
 enzimáticas. Se observaron cinéticas típicas de Michaelis-Menten para SPHK2
 recombinante (datos no mostrados). La Km para D-eritro-esfingosina como sustrato
 es 3.4 µM, casi idéntica a la Km encontrada previamente para SPHK1 (Olivera, A.,
 Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 12576-
 10 12583). Aunque el isómero natural D-eritro-esfingosina era el mejor sustrato para
 SPHK1 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S.,
J. Biol. Chem., **273**, (1998) 23722-23728), D-eritro-dihidroesfingosina fue un mejor
 sustrato para SPHK2 que D-eritro-esfingosina (figura 4A). Además, aunque D,L-
 treo-dihidroesfingosina y fitoesfingosina no fueron fosforiladas por SPHK1, fueron
 15 fosforiladas significativamente por SPHK2, aunque mucho menos eficientemente que
 la esfingosina. Como SPHK1, otros lípidos, incluyendo N,N-dimetilesfingosina
 (DMS), C2- o C16-ceramida, diacilglicerol y fosfatidilinositol, no fueron fosforilados
 por SPHK2 (figura 6A), sugiriendo alta especificidad para la base esfingoide. Se
 había mostrado previamente que DMS y DHS son potentes inhibidores competitivos
 20 de SPHK1 (Edsall, L. C., Van Brocklyn, J. R., Cuvillier, O., Kleuser, B. y Spiegel, S.,
Biochemistry, **37**, (1998), 12892-12898), y se han usado para bloquear el incremento
 del nivel intracelular de SPP que resulta de varios estímulos fisiológicos (Olivera, A. y
 Spiegel, S., Nature, **365**, (1993), 557-560; Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B.,
 Vanek, P. G., Coe, O. A., Gutkind, S. y Spiegel, S., Nature, **381**, (1996), 800-803;
 25 Edsall, L. C., Pirianov, G. G. y Spiegel, S., J. Neurosci., **17**, (1997), 6952-6960; Meyer
 zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C.,
 Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H. y van Koppen, C. J., EMBO J., **17**, 2830-2837;
 Choi, O. H., Kim, J.-H. y Kinet, J.-P., Nature, **380**, (1996), 634-636; Melendez, A.,

Floto, R. A., Gillooly, D. J., Hammett, M. M. y Allen, J. M., J. Biol. Chem., **273**, 9393-9402; Machwate, M., Rodan, S. B., Rodan, G. A. y Harada, S. I., Mol. Pharmacol., **54**, (1998), 70-77). Sin embargo, como DHS es un sustrato para SPHK2, y el producto, dihidro-SPP, es tan potente como SPP en la unión y activación de receptores de la familia EDG-1 de SPP de superficie celular, no se puede usar como una herramienta para investigar la función de SPHK2. De esta manera, fue importante caracterizar el potencial inhibidor de DMS no sustrato sobre SPHK2. Sorprendentemente, se encontró que aunque DMS también fue un inhibidor potente de SPHK2 (figura 4B), actuó de una manera no competitiva (figura 4C y figura 4D). La KI para DMS con SPHK2 fue 12 μ M, ligeramente más alta que la KI de 4 μ M con SPHK1, haciéndolo una herramienta útil para inhibir ambos tipos de SPHK.

La mSPHK2 tenía la actividad más alta en la escala de pH neutro de 6.5 a 8, con actividad óptima a pH 7.5 (figura 5A), una dependencia del pH similar a la de SPHK1 (datos no mostrados). La actividad disminuyó notablemente a valores de pH por abajo y por arriba de esta escala.

Efectos de KCl y NaCl

La mayor parte de la actividad de SPHK en plaquetas humanas está asociada a la membrana y es extraíble con NaCl 1M (Banno, Y., Kato, M., Hara, A. y Nozawa, Y., Biochem. J., **335**, (1998), 301-304). Además, la SPHK de plaquetas extraíble con sal tiene diferentes propiedades a las de la enzima citosólica. De este modo, era de interés determinar el efecto de altas concentraciones de sal sobre SPHK1 y SPHK2 recombinantes. De manera interesante, se encontró que la concentración iónica alta tenía efectos completamente opuestos en sus actividades. SPHK1 fue inhibida notablemente por NaCl y KCl causando cada una inhibición de 50% a una concentración de 200 mM (figura 5B). En contraste, la actividad de SPHK2 fue estimulada dramáticamente aumentando la concentración de sal, con un efecto máximo a una concentración de 400 mM, aunque KCl fue mucho más efectivo que NaCl. Sin embargo, por arriba de esta concentración, la actividad de SPHK2

disminuyó abruptamente, aunque permaneció elevada incluso a 1M de sal (figura 5C). De esta manera, las actividades de SPHK1 y SPHK2 tienen respuestas completamente opuestas a cambios en la concentración iónica. El análisis cinético de mSPHK2 en presencia o ausencia de altas concentraciones de sal indicó que la Km para esfingosina estuvo inalterada, pero la Vmax aumentó (figura 5D y figura 5E). El significado fisiológico de estas observaciones permanece por determinar, pero podría estar relacionado con diferentes localizaciones subcelulares.

Presentación de sustrato

10 Como los esfingolípidos son muy lipofílicos, en ensayos de SPHK *in vitro* la esfingosina es presentada usualmente en forma micelar con Triton X-100 o como un complejo con BSA (Olivera, A., Rosenthal, J. y Spiegel, S., J. Cell. Biochem., **60**, (1996), 529-537; Olivera, A., Barlow, K. D. y Spiegel, S., Methods Enzymol., **311**, (2000), 215-223). Además, se ha mostrado que detergentes como

15 Triton X-100 estimulan la actividad de SPHK en extractos de cerebro de rata (Buehrer, B. M. y Bell, R. M., J. Biol. Chem., **267**, (1992), 3154-3159) y la enzima de riñón de rata (Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 12576-12583), y se encontró previamente que la estabilidad de SPHK de riñón de rata se incrementó en presencia de ciertos detergentes (Olivera, A.,

20 Kohama, T., Tu, Z., Milstien y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 12576-12583). Sin embargo, cuando se comparó el efecto de concentraciones crecientes de Triton X-100 sobre las actividades de SPHK1 y SPHK2, se encontraron algunos resultados inesperados. Las concentraciones de detergente por debajo de 0.005% no tenían efecto, pero a concentraciones más altas se inhibió la actividad de SPHK2 y aumentó

25 notablemente la actividad de SPHK1 (figura 6A). A una concentración de Triton X-100 de 0.5%, la actividad de SPHK1 aumentó en más de 4 veces, mientras que SPHK2 fue inhibida casi completamente.

De manera interesante, el aumento de la concentración de BSA de las

condiciones usuales de ensayo de SPHK con complejo esfingosina-BSA como un sustrato, esto es, 0.2 mg/ml de BSA, causó una inhibición de la actividad de SPHK2 dependiente de la concentración, sin afectar la actividad de SPHK1 (figura 6B). Por lo tanto, cuando se mida la actividad de SPHK en extractos de célula o tejido, el método de preparación de sustrato, ya sea en micelas mezcladas o en complejos de BSA, se debe optimizar cuidadosamente porque los efectos diferenciales de Triton X-100 y BSA sobre la actividad, podrían dar diferentes resultados, dependiendo de la expresión relativa de los dos tipos de SPHK.

Efectos de fosfolípidos

- 10 Los fosfolípidos ácidos, particularmente fosfatidilserina, y ácido fosfatídico y fosfatidilinositol, y cardiolipina en menor grado, inducen un aumento en la actividad de SPHK dependiente de la dosis en lisados de fibroblastos Swiss 3T3, mientras que los fosfolípidos neutros no tienen efecto (Olivera, A., Rosenthal, J. y Spiegel, S., J. Cell. Biochem., **60**, (1996), 529-537). En concordancia, SPHK1 y
- 15 SPHK2 fueron estimulados por fosfatidilserina; la actividad de ambos aumentó máximamente 4 veces a una concentración de 40 µg/ml (figura 6C) y se inhibió por concentraciones más altas, de manera dependiente de la dosis. Estos efectos de fosfatidilserina parecen ser específicos, puesto que otros fosfolípidos, incluyendo fosfatidilcolina, no tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima. En contraste, las
- 20 actividades de las tres formas mayores de SPHK en plaquetas humanas no son afectadas por fosfatidilserina (Banno, Y., Kato, M., Hara, A. y Nozawa, Y., Biochem. J., **335**, (1998), 301-304).

El mecanismo mediante el cual la fosfatidilserina incrementa la actividad enzimática de SPHK no está bien comprendido. Una posibilidad es que la fosfatidilserina posee propiedades únicas de estructura de membrana que presentan mejor el sustrato, esfingosina. Una segunda posibilidad es que SPHK contiene determinantes que reconocen específicamente la estructura del grupo de cabeza de serina, y que estos determinantes solo pueden llegar a exponerse por interacción de

SPHK con membranas. A este respecto, la base molecular para la notable especificidad de proteína cinasa K por fosfatidilserina, ha sido el sujeto de mucho debate. Sin embargo, datos recientes revelan que la estructura del lípido y no la estructura de la membrana, es el mayor determinante en la regulación de proteína cinasa C por fosfatidilserina (Johnson, J. E., Zimmerman, M. L., Daleke, D. L. y Newton, A. C., Biochemistry, **37**, (1998), 12020-12025).

La presencia de ESTs múltiples en la base de datos con homologías significativas con SPHK1, así como la identificación de varios genes en *S. cerevisiae* que codifican diferentes SPHKs (Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L. y Dickson, R. C., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 19437-19442) sugiere que puede haber una familia de genes de SPHK grande e importante. Aunque SPHK2 tiene un alto grado de homología con SPHK1, especialmente en los dominios conservados previamente identificados, identificados en SPHKs de tipo 1 (Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R. y Spiegel, S., J. Biol. Chem., **273**, (1998), 23722-23728), es mucho más grande (65.2 y 65.6 kDa para SPHK1 y SPHK2, respectivamente, contra 42.4 kDa para mSPHK1a), y contiene 236 aminoácidos adicionales. Además, su expresión diferencial en tejido, expresión temporal en el desarrollo, localización celular y propiedades cinéticas en respuesta a concentración iónica creciente y detergentes, son completamente diferentes de las de SPHK1, sugiriendo que muy probablemente tiene una función diferente y regula los niveles de SPP de una manera diferente que SPHK1, que se sabe tiene una función prominente en la regulación del crecimiento y supervivencia celular. De esta manera, se considera que SPHK del tipo 2 está involucrada en la regulación de algunas de las numerosas respuestas biológicas atribuidas a SPP, tales como angiogénesis y respuestas alérgicas.

Secuencia para GenBank 1 EMBC Bank Accession No. bankit325787

1 aattcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggcctcca gaaccaaaga gaagtcagcc
 61 tgaggaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggccttcc ccgtccctgc tctaacactc
 121 tccaggggta aagggaaccgg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgcg
 5 181 tggtgactct ctggccgcac gccgaccgt tctcgggtggc tcgaggagga cccgggtggc
 241 tgtgtgtcgg agcctccgaa gtagctggaa tcaccgtctt tcaacacttg gcctggctct
 301 gccatttaa gttgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta
 361 ggagtgtctg ggactgaacc agggatcatgg cccaccacc actactgcca gtggctgcca
 421 gcactccaat ccgcaacggc gagtttgggt cctaccggc caacggccca cggtttgccc
 481 tcacctcac aacacaagcc ctacacatac agcgactacg ccaaagcca gaagcccggc
 541 cccgagatgg tctagtctct ctggtatgagg tctcgggctg tggcaccctg cagagccgta
 10 601 gccccgagga cactgcagcc tacttctgca tctacaccta cccacgtggc cgtcagagggg
 661 gccggcgag agctacgagg accttcgggg cggatggggc caccacttat gaggagaatc
 721 gtgcagaggg ccagcgctgg gccactgccc tcacgtgtct cctccgagga gtgcctctgt
 781 caggggacca ggaaatcacc cctgaattgc tgccccggaa gccagggctg ctcatattgg
 841 tcaatccctt tggggggcgg ggccctggcct ggagcgctg tatggaccac gtggtgccaa
 901 tgatctctga agctgggctg tcttcaacc tcatacagac agaacgacag aacctgccc
 961 gtgagctggt gcagggggta agcctgagtg agtgggaagg cattgtcact gtgtctggag
 15 1021 acgggctgct ttacgaggtg ctgaatgggc tcttgatcg gccagactgg gaggatgccg
 1081 tgcggatgcc catiggtgtc ctccctgtg gatcgggcaa tgcgctagct ggggcggtga
 1141 gccatcatgg cgggttgag caggttgtcg gtgttgacct gtgtctcaac tgctcgctc
 1201 ttctctgccc tggtggcagc catcctctgg acttgctctc tgtgacgcta gcctcgggat
 1261 ccgctgttt ttcttctg tcagtggcct ggggattctt gtcagatgtg gacattcaca
 1321 gtgagcgctt cagggccctg ggcagcgctc gattcacact gggtcagtg ctaggcctgg
 20 1381 cctcgttgca tacctaccgt ggacgcctct cctacctccc cgctaccaca gaaccagcct
 1441 tgcccatccc aggcacagt ctgcctcgag ccaagtcaga actagtcttg gctccagccc
 1501 cagccccgc cgcacccac tcgctctac atcgatctgt gtctgacctg cccctgccc
 1561 ttcccagcc tgcctgggtc tcccctggct cccctgagcc cctgcctgac ctgtccctca
 1621 atggtgggtg tccagagctg actggagact ggggaggagc tggggatgca cctctgtccc
 1681 cagaccact gctgccttca tccccaaac ctctcaaac agctcagctt tcacctatcg

1741 ctgaagggcc cccagaaaig ccagcatctt cgggggttct gccctcccacc cacagtgcc
 1801 cagaagcctc tacctggggc ccagtggacc acctctccc tcccctgggc tctccactgc
 1861 cccaagactg ggtgacaata gagggggagt ttgtactcat gtggggcatc ttgacgagcc
 1921 acctctgcgc agacctgatg gcagccccac atgcacgctt tgatgatggc gttgtgcacc
 1981 tgtgtgggt gcggagcggc atctcacggg ctgcacttct acgcatttt ctggccatgg
 2041 agcatggaaa ccacttcagc ctgggctgcc cccatctggg ctatgtgca gcacgtgcct
 2101 tccgcctga accactcacg cctcgtggcc tgctcactgt agatggggag ttatggagt
 2161 atgggccaat acaggcgag gtgcaccag gtctcgccac gctgctcact gggcctgcag
 2221 gtcaaaagcc acaagcctga acgagcctaa aagcatggcg agttggtgga accagcgccc
 2281 cataggctaa gatctatcat ttacaggtag aagtggggcc cgcactcaga actgtgagga
 2341 ggggtggagag tggctcagac cctcagttcc cagaggacct agaggctcga ggggtggggc
 2401 tgcttttct gatgtccaat gatggggcct ggaatgtatg agctagcaag gcttctcag
 2461 ctattgacc agccagggtt tctcttgcc tactccggtg cctctacttg actggccaat
 2521 cagccctga ggggcagggt ccccagggtg gtcccagat ttgactaat gttctcccc
 2581 tggccagta gggatgggat gttctgtgc ttgtgtgtcc ctctccctag tctaaaaagc
 2641 aatigaaaag gtctatgcaa taaagggtgt tgcttccctc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Secuencia para Gen Bank 1 EMBC Bank Accession No.bank1325752

1 gccaccatgg ccccgcccc accgccactg gctgccagca ccccgctcct ccatggcgag
 61 ttggctct accagccc agggccacgc ttgcccctca ccctacatc gcaggccctg
 121 cacatacagc ggctgcgccc caaacctgaa gccaggcccc ggggtggcct ggtcccgttg
 181 gccgaggtct caggctgctg caccctgcga agccgcagcc cctcagactc agcggcctac
 241 ttctgcatct acacctaccc tcggggccgg cgcgggggccc ggcgcagagc cactgcacc
 301 ttccgggcag atggggccgc cacctacgaa gagaaccgtg ccgaggccca gcgctggggc
 361 actgccctca cctgtctgt cagaggactg ccactgccc gggatgggga gatcaccct
 421 gacctgctac ctggccgccc ccggtgtct ctattgtca atcccttgg gggctggggc
 481 ctggcctggc agtgggtgaa gaaccacgtg ctcccatga tctctgaagc tgggctgtcc
 541 ttcaacctca tccagacaga acgacagaac cacgcccggg agctggtcca ggggctgagc

601 ctgagtgagt gggatggcat cgtcacggtc tcgggagacg ggctgctcca tgagggtgctg
 661 aacgggctcc tagatcgccc tgactgggag gaagctgtga agatgcctgt gggcatcctc
 721 cctgcggtc cgggcaacgc gctggccgga gcagtgaacc agcacggggg attgagcca
 781 gccctgggcc tcgacctgtt gctcaactgc tcactgttgc tgtgccgggg tggtgccac
 841 ccactggacc tgctctccgt gacgtggcc tcgggctccc gctgttctc ctctctgt
 901 gtggcctggg gcttcgtgc agatgtggat atccagagcg agcgcttcag ggccttggg
 961 agtggcgtc tcacactggg caggtgtctg ggcttcgcca cactgcacac ctaccgcgga
 1021 cgctctctc acctcccgcc cactgtgaa cctgcctgc ccacctgc ccatagcctg
 1081 cctcgtgcca agtcggagct gacctaac ccagaccag ccccgccat ggccactca
 1141 cccctgcac gtctgtgc tgacctgc ctccccgc cccagcctgc cctggcctt
 1201 cctggctgc cagaacctt gccatcctg tccctaacg gtgggggccc agagctggg
 1261 ggggactggg gtggggctgg ggatgtccg ctgtcccg accactgtc gcttcacct
 1321 cctggctctc ccaaggcagc tctacactca cccgtctcg aaggggccc cgtattccc
 1381 ccatcctctg ggctccact tccacctt gatgcccgg taggggctc cgacctgccc
 1441 ccggcgacc acctgctgc tccgtgggc acccgctgc cccagactg gtgacgtg
 1501 gagggggact ttgtctcat gttggccatc tcggccagcc acctaggcgc tgacctgtg
 1561 gcagctcgc atgcgcgtt cgacgacggc ctgtgcacc tgtctgggt gcgtagcgg
 1621 atctcgggg ctgcgtgtc ggcctttc ttggccatgg agcgtggtag ccacttcagc
 1681 ctgggtgtc cgcagctgg ctacgcgcg gcccgctct tccgctaga gcgctcaca
 1741 ccacgcggcg tctcacagt ggacggggag caggtggagt atggccgct acaggcacag
 1801 atgcacctg gcatcgtac actgtcact gggcctctg gctgccggg gcgggagccc
 1861 tgaaactaaa caagcttgtt acctcgggg ggcggggctt acattccat ggggcggagc
 1921 ttgagctagg ggtgtggc ttgctgtag agttgtgtg gcaggggccc tggccccgc
 1981 tcaggatgc gctcgcttc atgggaccag acgtgatgt ggaagggtgg cgtcgtcacg
 2041 gttaaagaga aatgggctc tccgagggg agtcctgat caatgagggc ggggcctggc
 2101 gtctgatctg gggccgccc tacggggcag ggtcagtc tgacgctgc cactgtctc
 2161 taccggcca ggaaggctga gggcgagtc tttttacgc gtgccaat gacaggacct
 2221 ggaatgtact ggctgggga ggcctcagt agtcggccg tcagggccc cagcctcgc
 2281 ccatccactc cgtgcctc attagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggtccccg
 2341 gggccgggc taggattgc actaatgtc ctctccccg

SEQ ID NO. 14**Secuencia de aminoácidos de SPHK2 de humano**

5

MAPPPPPLAASTPLLHGEFGSYPARGPRFALTLSQALHIQRLRPKPEARPRGGL
VPLAEVSGCCTLRSR

SPSDSAAYFCIYTYPRGRRGARRRATRTFRADGAATYEENRAEAQRWATALTCL
LRGLPLPGDGEITPDL

LPRPPRLLLLVNPFGGRGLAWQWCKNHVLPMISEAGLSFNLIQTERQNHARELV
QGLSLSEWDGIVTVSG

10

DGLLHEVLNGLLDRPDWEEAVKMPVGILPCGSGNALAGAVNQHGGEFEPALGLD
LLNCSLLLLCRGGGHPL

DLLSVTLASGSRCFSFLSVAWGFVSDVDIQSERFRALGSARFTLGTVLGLATLHT
YRGRLSYLPATVEPA

SPTPAHSLPRAKSELTLPDPAPPMASPLHRSVSDLPLPLPQPALASPGSPEPL
PILSLNGGGPELAGD

15

WGGAGDAPLSPDLLSSPPGSPKAALHSPVSEGAPVIPSSGLPLPTPDARVGA
STCGPPDHLLPPLGTP

LPPDWVTLEGDFVLMIAISPSHLGADLVAAPHARFDDGLVHLCWVRSGISRAALL
RLFLAMERGSFHSLG

CPQLGYAAARAFLRLEPLTPRGVLTVDGEQVEYGPLQAQMHPGIGTLLTGPPGCP
GREP

SEQ ID NO. 12**Secuencia de aminoácidos de SPHK2 de ratón**

5

MAPPPLLVAASTPILHGEFGSYPANGPRFALTLTTQALHIQRLRPKPEARPRD
GLVSLDEVSGCGTLQS

RSPEDTAAYFCIYTYPRGRRGGRRRATRTFRADGATTYEENRAEAQRWATALT
CLLRGVPLSGDQEITPE

LLPRKPRLILVNPFGGRGLAWQRCMDHVVPMISEAGLSFNLIQTERQNHAREL

10

VQGLSLSEWEGIVTVS

GDGLLYEVLNGLLDRPDWEDAVRMPIGVLPCGSGNALAGAVSHHGGFEQVVG
VDLLNCSLLLCRGGSHP

LDLLSVTLASGSRCFSFLSVAWGFLSDVDIHSEFRALGSARFTLGAVLGLASL
HTYRGRLSYLPATTEP

ALPIPGHSLPRAKSELVLAPAPAPAATHSPLHRSVSDLPLPLPQPALVSPGSPEP
LPDLSLNGGGPELTG

DWGGAGDAPLSPDPLLPSSPNALKTAQLSPIAEGPPEMPASSGFLPPTHSAPE
ASTWGPVDHLLPPLGSP

LPQDWVTIEGEFVLMLGILTSHLCADLMAAPHARFDDGVVHLCWVRSGISRAAL
LRIFLAMEHGNHFSLG

CPHLGYAAARAFRLEPLTPRGLLTVDGELVEYGPIQAQVHPGLATLLTGPAQK
PQA

Se apreciará que la presente especificación se expone a manera de ilustración y no de limitación, y que se pueden hacer varios cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> SANKYO COMPANY, LIMITED
GEORGETOWN UNIVERSITY
- <120> Isoformas de esfingosina cinasa tipo 2 de mamífero, clonación, expresión y métodos de uso de las mismas.
- <130> 00170PCT/HG
- <140>
<141>
- 15 <150> US 60/194,318
<151> 2000-04-03
- <160> 15
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- 20 <210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus
- <400> 1
cctgggtgca cctgcgcctg tattgg 26
- <210> 2
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus
- 25 <400> 2
ccagtcttgg ggcaagtggag agcc 24
- <210> 3
<211> 16
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 3
aggttagaggc ttctgg

16

<210> 4
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Iniciador de Ancla Abreviado 5'RACE

<220>
<221> base modificada
<222> (24)..(25)
<223> i

○ 10

<220>
<221> base modificada
<222> (29)..(30)
<223> i

<220>
<221> base modificada
<222> (34)..(35)
<223> i

15

<400> 4
ggccacgcgt cgactagtagc gggnnngggnn gggngg 36

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Mus musculus

○

<400> 5
gcgatgggtg aaagctgagc tg 22

20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Iniciador de Amplificación
Universal Abreviado

25

		<400> 6	
		ggccacgcgt cgactagtac	20
		<210> 7	
		<211> 22	
5		<212> ADN	
		<213> Mus musculus	
		<400> 7	
		agtctccagt cagctctgga cc	22
		<210> 8	
		<211> 16	
		<212> ADN	
10		<213> Homo sapiens	
		<400> 8	
		cccactcact caggct	16
		<210> 9	
		<211> 22	
		<212> ADN	
		<213> Homo sapiens	
15		<400> 9	
		gaaggacagc ccagcttcag ag	22
		<210> 10	
		<211> 20	
		<212> ADN	
		<213> Homo sapiens	
20		<400> 10	
		attgaccaat agaagcaacc	20

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(2237)

5

<300>

<302> "Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform"

<303> J. Biol. Chem.

<304> 275

<305> 28

<306> 19513-19520

<308> AF245448

i

10

<400> 11

aatcggcac gagggaggac cgagtaaacc gaggcctcca gaaccaaaga gaagtcagcc 60

tgaggaaagg gctgggaccc ggagcctctc tggccttcc ccgtccctgc tctaacactc 120

tccaggggta aagggaccgg agaatcagag acatgatcgg agcttgctgg acgagtcgcg 180

15

tggtgactct ctggccgcac gccgaccgct tctcggctgg tcgcggagga cccggctggc 240

tgtgtgtcgg agcctccgaa gtagctggaa tcaccgtctt tcaacacttg gcctggctct 300

i

gccatttaaa gtgtgatct tggaggctgg tccaggagct gaccacaagc caagagccta 360

20

ggagtgttg ggactgaacc agggtc atg gcc cca cca cca cta ctg cca gtg 413

Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val

1

5

gct gcc agc act cca atc ctg cac ggc gag ttt ggt tcc tac ccg gcc 461

Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala

25

10

15

20

25

aac ggc cca cgg ttt gcc ctc acc ctc aca aca caa gcc cta cac ata 509

Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile

30 35 40

5

cag cga cta cgc cca aag cca gaa gcc cgg ccc cga gat ggt cta gtc 557

Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val

45 50 55

tct ctg gat gag gtc tgg ggc tgt ggc acc ctg cag agc cgt agc ccc 605

Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro

10 60 65 70

gag gac act gca gcc tac ttc tgc atc tac acc tac cca cgt ggc cgt 653

Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg

75 80 85

15

cga ggg ggc cgg cgc aga gct acg cgg acc ttc cgg gcg gat ggg gcc 701

Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala

90 95 100 105

acc act tat gag gag aat cgt gca gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc 749

Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala

110 115 120

20

ctc acg tgt ctc ctc cga gga gtg cct ctg tca ggg gac cag gaa atc 797

Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile

Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val

155 160 165

5 gtg cca atg atc tct gaa gct ggg ctg tcc ttc aac ctc ata cag aca 941

Val Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr

170 175 180 185

gaa cga cag aac cat gcc cgt gag ctg gtg cag ggg tta agc ctg agt 989

Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser

190 195 200

10

gag tgg gaa ggc att gtc act gtg tct gga gac ggg ctg ctt tac gag 1037

Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu

205 210 215

gtg ctg aat ggg ctc ctt gat cgg cca gac tgg gag gat gcc gtg cgg 1085

Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg

15

220 225 230

atg ccc att ggt gtc ctc ccc tgt gga tgg ggc aat gcg cta gct ggg 1133

Met Pro Ile Gly Val Leu Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly

235 240 245

20

gcg gtg agc cat cat ggc ggg ttt gag cag gtt gtc ggt gtt gac ctg 1181

Ala Val Ser His His Gly Gly Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu

250 255 260 265

ttg ctc aac tgc tgg ctt ctt ctc tgc cgt ggt ggc agc cat cct ctg 1229

Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu

270 275 280

25

gac ttg ctc tct gtg acg cta gcc tgg gga tcc cgc tgt ttt tcc ttc 1277
 Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe
 285 290 295

5

ctg tca gtg gcc tgg gga ttc ttg tca gat gtg gac att cac agt gag 1325
 Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu
 300 305 310

cgc ttc agg gcc ctg ggc agc gct cga ttc aca ctg ggt gca gtg cta 1373
 Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu
 315 320 325

10

ggc ctg gcc tgg ttg cat acc tac cgt gga cgc ctc tcc tac ctc ccc 1421
 Gly Leu Ala Ser Leu His Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro
 330 335 340 345

15

gct acc aca gaa cca gcc ttg ccc atc cca ggc cac agt ctg cct cga 1489
 Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg
 350 355 360

gcc aag tca gaa cta gtc ttg gct cca gcc cca gcc ccc gcc gcc acc 1517
 Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr
 365 370 375

20

cac tgg cct cta cat cga tct gtg tct gac ctg ccc ctg ccc ctt ccc 1565
 His Ser Pro Leu His Arg Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro
 380 385 390

cag cct gcc ttg gtc tcc cct ggc tcc cct gag ccc ctg cct gac ctg 1613
 Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu
 395 400 405

25

tcc ctc aat ggt ggt ggt cca gag ctg act gga gac tgg gga gga gct 1661
 Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala
 410 415 420 425

5 ggg gat gca cct ctg tcc cca gac cca ctg ctg cct tca tcc ccc aac 1709
 Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn
 430 435 440

gct ctc aaa aca gct cag ctt tca ccc atc gct gaa ggg ccc cca gaa 1757
 Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu
 445 450 455

10 atg cca gca tct tgg ggg ttc ctg cct ccc acc cac agt gcc cca gaa 1805
 Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu
 460 465 470

15 gcc tct acc tgg ggc cca gtg gac cac ctc ctc cct ccc ctg ggc tct 1853
 Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser
 475 480 485

cca ctg ccc caa gac tgg gtg aca ata gag ggg gag ttt gta ctc atg 1901
 Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met
 490 495 500 505

20 ttg ggc atc ttg acg agc cac ctc tgc gca gac ctg atg gca gcc cca 1949
 Leu Gly Ile Leu Thr Ser His Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro
 510 515 520

cat gca cgc ttt gat gat ggc gtt gtg cac ctg tgt tgg gtg cgg agc 1997
 His Ala Arg Phe Asp Asp Gly Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser
 525 530 535

25

ggc atc tca cgg gct gca ctt cta cgc att ttt ctg gcc atg gag cat 2045
 Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His
 540 545 550

5 gga aac cac ttc agc ctg ggc tgc ccc cat ctg ggc tat gct gca gca 2093
 Gly Asn His Phe Ser Leu Gly Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala
 555 560 565

cgt gcc ttc cgc ctt gaa cca ctg acg cct cgt ggc ctg ctg act gta 2141
 Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val
 570 575 580 585

gat ggg gag tta gtg gag tat ggg cca ata cag gcg cag gtg cac cca 2189
 Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro
 590 595 600

ggc ctg gcc acg ctg ctg act ggg cct gca ggt caa aag cca caa gcc 2237
 Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
 605 610 615

tgaacgagcc taaaagcatg gcgagttggt ggaaccagcg ccccataggc taagatctat 2297

catttacagg tagaagtggg gccgcacac agaactgtga ggagggtgga gattggtcct 2357

gaccctcagt toccagagga cctagaggct cgagggtggg gcctgccttt ctgatgicc 2417

aatgatgggg cctggaatgt atgagctagc aaggcttctt cagcttattg accagccagg 2477

gtttcttctt gcctactccg gtgcctctac ttgactggcc aatcagccct tgaggggcag 2537

25

gttccccag gtggccccca gatttgcact aatgttctc ccctggccag ttagggatgg 2597

gatgtctgt gtcttggtg tccctctccc tagtctaaaa agcaattgaa aaggctctatg 2657

5

caataaaggt tgttgcttcc ctctaaaaaa aaaaaaaaaa a 2698

<210> 12

<211> 617

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 12

Met Ala Pro Pro Pro Leu Leu Pro Val Ala Ala Ser Thr Pro Ile Leu

1 5 10 15

His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ala Leu

20 25 30

15

Thr Leu Thr Thr Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro

35 40 45

Glu Ala Arg Pro Arg Asp Gly Leu Val Ser Leu Asp Glu Val Ser Gly

50 55 60

20

Cys Gly Thr Leu Gln Ser Arg Ser Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe

65 70 75 80

Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Gly Arg Arg Ala

85 90 95

25

Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Asn Arg
100 105 110

Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly
5 115 120 125

Val Pro Leu Ser Gly Asp Gln Glu Ile Thr Pro Glu Leu Leu Pro Arg
130 135 140

Lys Pro Arg Leu Leu Ile Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu
10 145 150 155 160

Ala Trp Gln Arg Cys Met Asp His Val Val Pro Met Ile Ser Glu Ala
165 170 175

Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg
180 185 190

Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Glu Gly Ile Val Thr
15 195 200 205

Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu Tyr Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp
210 215 220

Arg Pro Asp Trp Glu Asp Ala Val Arg Met Pro Ile Gly Val Leu Pro
20 225 230 235 240

Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Ser His His Gly Gly
245 250 255

Phe Glu Gln Val Val Gly Val Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu
25

260 265 270

Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu

275 280 285

5

Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe

290 295 300

Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser

305 310 315 320

Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu Gly Leu Ala Ser Leu His Thr

325 330 335

10

Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu

340 345 350

Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu

355 360 365

15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr His Ser Pro Leu His Arg Ser

370 375 380

Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro

385 390 395 400

20

Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro

405 410 415

Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro

420 425 430

260 265 270

Leu Cys Arg Gly Gly Ser His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu

275 280 285

5

Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe

290 295 300

Leu Ser Asp Val Asp Ile His Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser

305 310 315 320

Ala Arg Phe Thr Leu Gly Ala Val Leu Gly Leu Ala Ser Leu His Thr

325 330 335

10

Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Thr Glu Pro Ala Leu

340 345 350

Pro Ile Pro Gly His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Val Leu

355 360 365

15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Thr His Ser Pro Leu His Arg Ser

370 375 380

Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Val Ser Pro

385 390 395 400

20

Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Asp Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro

405 410 415

Glu Leu Thr Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro

420 425 430

208

Asp Pro Leu Leu Pro Ser Ser Pro Asn Ala Leu Lys Thr Ala Gln Leu
435 440 445

5 Ser Pro Ile Ala Glu Gly Pro Pro Glu Met Pro Ala Ser Ser Gly Phe
450 455 460

Leu Pro Pro Thr His Ser Ala Pro Glu Ala Ser Thr Trp Gly Pro Val
465 470 475 480

10 Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Ser Pro Leu Pro Gln Asp Trp Val
485 490 495

Thr Ile Glu Gly Glu Phe Val Leu Met Leu Gly Ile Leu Thr Ser His
500 505 510

15 Leu Cys Ala Asp Leu Met Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
515 520 525
Val Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
530 535 540

Leu Arg Ile Phe Leu Ala Met Glu His Gly Asn His Phe Ser Leu Gly
545 550 555 560

20 Cys Pro His Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu Glu Pro
565 570 575

Leu Thr Pro Arg Gly Leu Leu Thr Val Asp Gly Glu Leu Val Glu Tyr

Gly Pro Ile Gln Ala Gln Val His Pro Gly Leu Ala Thr Leu Leu Thr
595 600 605

5

Gly Pro Ala Gly Gln Lys Pro Gln Ala
610 615

<210> 13
<211> 2380
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (7)..(1860)

<300>
<302> "Molecular cloning and functional characterization of a
 novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform"
<303> J. Biol. Chem.
<304> 275
<305> 26
<306> 19513-19520
<308> AF245447

<400> 13
gccacc atg gcc ccg ccc cca ccg cca ctg gct gcc agc acc ccg ctc 48
Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu
1 5 10

25

ctc cat ggc gag ttg ggc tcc tac cca gcc cga ggc cca cgc ttg gcc 96
 Leu His Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala
 5 15 20 25 30

ctc acc ctt aca tcg cag gcc ctg cac ata cag cgg ctg cgc ccc aaa 144
 Leu Thr Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys
 35 40 45

cct gaa gcc agg ccc cgg ggt ggc ctg gtc ccg ttg gcc gag gtc tca 192
 Pro Glu Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser
 50 55 60

ggc tgc tgc acc ctg cga agc cgc agc ccc tca gac tca gcg gcc tac 240
 Gly Cys Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr
 65 70 75

ttc tgc atc tac acc tac cct cgg ggc cgg cgc ggg gcc cgg cgc aga 288
 Phe Cys Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg
 80 85 90

gcc act cgc acc ttc cgg gca gat ggg gcc gcc acc tac gaa gag aac 336
 Ala Thr Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn
 20 95 100 105 110

cgt gcc gag gcc cag cgc tgg gcc act gcc ctc acc tgt ctg ctc cga 384
 Arg Ala Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg
 115 120 125

gga ctg cca ctg ccc ggg gat ggg gag atc acc cct gac ctg cta cct 432
 Gly Leu Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro
 130 135 140

5 145 150 155
 cgg ccg ccc cgg ttg ctt cta ttg gtc aat ccc ttt ggg ggt cgg ggc 480
 Arg Pro Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly

ctg gcc tgg cag tgg tgt aag aac cac gtg ctt ccc atg atc tct gaa 528
 Leu Ala Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu
 160 165 170

10 175 180 185 190
 gct ggg ctg tcc ttc aac ctc atc cag aca gaa cga cag aac cac gcc 576
 Ala Gly Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala

cgg gag ctg gtc cag ggg ctg agc ctg agt gag tgg gat ggc atc gtc 624
 Arg Glu Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val
 195 200 205

15 210 215 220
 acg gtc tcg gga gac ggg ctg ctc cat gag gtg ctg aac ggg ctc cta 672
 Thr Val Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu

20 225 230 235
 gat cgc cct gac tgg gag gaa gct gtg aag atg cct gtg ggc atc ctc 720
 Asp Arg Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu

ccc tgc ggc tcg ggc aac gcg ctg gcc gga gca gtg aac cag cac ggg 768
 Pro Cys Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly
 240 245 250

gga ttt gag cca gcc ctg ggc ctc gac ctg ttg ctc aac tgc tca ctg 816
 Gly Phe Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu
 255 260 265 270

ttg ctg tgc cgg ggt ggt ggc cac cca ctg gac ctg ctc tcc gtg acg 864
 Leu Leu Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr
 275 280 285

5 ctg gcc tgc ggc tcc cgc tgt ttc tcc ttc ctg tct gtg gcc tgg ggc 912
 Leu Ala Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly
 290 295 300

ttc gtg tca gat gtg gat atc cag agc gag cgc ttc agg gcc ttg ggc 960
 Phe Val Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly
 305 310 315

10 agt gcc cgc ttc aca ctg ggc acg gtg ctg ggc ctc gcc aca ctg cac 1008
 Ser Ala Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His
 320 325 330

15 acc tac cgc gga cgc ctc tcc tac ctc ccc gcc act gtg gaa cct gcc 1056
 Thr Tyr Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala
 335 340 345 350
 tgc ccc acc cct gcc cat agc ctg cct cgt gcc aag tgc gag ctg acc 1104
 Ser Pro Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr
 355 360 365

20 cta acc cca gac cca gcc ccg ccc atg gcc cac tca ccc ctg cat cgt 1152
 Leu Thr Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg
 370 375 380

tct gtg tct gac ctg cct ctt ccc ctg ccc cag cct gcc ctg gcc tct 1200
 Ser Val Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser

25

385 390 395

cct ggc tgc cca gaa ccc ctg ccc atc ctg tcc ctc aac ggt ggg ggc 1248

Pro Gly Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly

5 400 405 410

cca gag ctg gct ggg gac tgg ggt ggg gct ggg gat gct ccg ctg tcc 1296

Pro Glu Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser

415 420 425 430

ccg gac cca ctg ctg tct tca cct cct ggc tct ccc aag gca gct cta 1344

Pro Asp Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu

435 440 445

cac tca ccc gtc tcc gaa ggg gcc ccc gta att ccc cca tcc tct ggg 1392

His Ser Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly

450 455 460

ctc cca ctt ccc acc cct gat gcc cgg gta ggg gcc tcc acc tgc ggc 1440

Leu Pro Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly

465 470 475

ccg ccc gac cac ctg ctg cct ccg ctg ggc acc ccg ctg ccc cca gac 1488

Pro Pro Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp

480 485 490

tgg gtg acg ctg gag ggg gac ttt gtg ctc atg ttg gcc atc tgc ccc 1536

Trp Val Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro

495 500 505 510

agc cac cta ggc gct gac ctg gtg gca gct ccg cat gcg cgc ttc gac 1584

Ser His Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp
515 520 525

5 gac ggc ctg gtg cac ctg tgc tgg gtg cgt agc ggc atc tgg cgg gct 1632
Asp Gly Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala
530 535 540

gcg ctg ctg cgc ctt ttc ttg gcc atg gag cgt ggt agc cac ttc agc 1680
Ala Leu Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser
545 550 555

10 ctg ggc tgt ccg cag ctg ggc tac gcc gcg gcc cgt gcc ttc cgc cta 1728
Leu Gly Cys Pro Gln Leu Gly Tyr Ala Ala Ala Arg Ala Phe Arg Leu
560 565 570

15 gag ccg ctg aca cca cgc ggc gtg ctg aca gtg gac ggg gag cag gtg 1776
Glu Pro Leu Thr Pro Arg Gly Val Leu Thr Val Asp Gly Glu Gln Val
575 580 585 590

gag tat ggg ccg cta cag gca cag atg cac cct ggc atc ggt aca ctg 1824
Glu Tyr Gly Pro Leu Gln Ala Gln Met His Pro Gly Ile Gly Thr Leu
595 600 605

20 ctg act ggg cct cct ggc tgc ccg ggg cgg gag ccc tgaactaaa 1870
Leu Thr Gly Pro Pro Gly Cys Pro Gly Arg Glu Pro
610 615

caagcttggt acccgccggg ggcggggcct acattccaat ggggcggagc ttgagctagg 1930

25 ggggtggcc tggctgctag agttgtggtg gcagggggccc tggccccgtc tcaggattgc 1990

gctcgctttc atgggaccag acgtgatgct ggaagggtggg cgtcgtcacg gttaaagaga 2050

aatgggctcg tcccgagggt agtgccctgat caatgagggc ggggcctggc gtctgatctg 2110

5

gggcccctt tacggggcag ggctcagtc tgacgcttc cactgctcc taccggcca 2170

ggatggctga gggcggagtc tatttacgc gtgcaccaat gacaggacct ggaatgtact 2230

ggctggggta ggcctcagtg agtcggccgg tcagggcccg cagcctcgcc ccatccactc 2290

10

cggtgccctc atttagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggtccccg gggccggcgc 2350

taggatttgc actaatgttc ctctccccgc 2380

<210> 14

<211> 618

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 14

Met Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ala Ala Ser Thr Pro Leu Leu His

1 5 10 15

Gly Glu Phe Gly Ser Tyr Pro Ala Arg Gly Pro Arg Phe Ala Leu Thr

20 25 30

20

Leu Thr Ser Gln Ala Leu His Ile Gln Arg Leu Arg Pro Lys Pro Glu

35 40 45

Ala Arg Pro Arg Gly Gly Leu Val Pro Leu Ala Glu Val Ser Gly Cys

50 55 60

Cys Thr Leu Arg Ser Arg Ser Pro Ser Asp Ser Ala Ala Tyr Phe Cys

5

65 70 75 80

Ile Tyr Thr Tyr Pro Arg Gly Arg Arg Gly Ala Arg Arg Arg Ala Thr

85 90 95

Arg Thr Phe Arg Ala Asp Gly Ala Ala Thr Tyr Glu Glu Asn Arg Ala

100 105 110

10

Glu Ala Gln Arg Trp Ala Thr Ala Leu Thr Cys Leu Leu Arg Gly Leu

115 120 125

Pro Leu Pro Gly Asp Gly Glu Ile Thr Pro Asp Leu Leu Pro Arg Pro

130 135 140

15

Pro Arg Leu Leu Leu Leu Val Asn Pro Phe Gly Gly Arg Gly Leu Ala

145 150 155 160

Trp Gln Trp Cys Lys Asn His Val Leu Pro Met Ile Ser Glu Ala Gly

165 170 175

Leu Ser Phe Asn Leu Ile Gln Thr Glu Arg Gln Asn His Ala Arg Glu

180 185 190

20

Leu Val Gln Gly Leu Ser Leu Ser Glu Trp Asp Gly Ile Val Thr Val

195 200 205

Ser Gly Asp Gly Leu Leu His Glu Val Leu Asn Gly Leu Leu Asp Arg

210 215 220

25

Pro Asp Trp Glu Glu Ala Val Lys Met Pro Val Gly Ile Leu Pro Cys
 225 230 235 240

5 Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Gly Ala Val Asn Gln His Gly Gly Phe
 245 250 255

Glu Pro Ala Leu Gly Leu Asp Leu Leu Leu Asn Cys Ser Leu Leu Leu
 260 265 270

10 Cys Arg Gly Gly Gly His Pro Leu Asp Leu Leu Ser Val Thr Leu Ala
 275 280 285

Ser Gly Ser Arg Cys Phe Ser Phe Leu Ser Val Ala Trp Gly Phe Val
 290 295 300

15 Ser Asp Val Asp Ile Gln Ser Glu Arg Phe Arg Ala Leu Gly Ser Ala
 305 310 315 320

Arg Phe Thr Leu Gly Thr Val Leu Gly Leu Ala Thr Leu His Thr Tyr
 325 330 335

20 Arg Gly Arg Leu Ser Tyr Leu Pro Ala Thr Val Glu Pro Ala Ser Pro
 340 345 350

Thr Pro Ala His Ser Leu Pro Arg Ala Lys Ser Glu Leu Thr Leu Thr
 355 360 365

Pro Asp Pro Ala Pro Pro Met Ala His Ser Pro Leu His Arg Ser Val
 370 375 380

Ser Asp Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gln Pro Ala Leu Ala Ser Pro Gly
 385 390 395 400
 Ser Pro Glu Pro Leu Pro Ile Leu Ser Leu Asn Gly Gly Gly Pro Glu
 5 405 410 415

 Leu Ala Gly Asp Trp Gly Gly Ala Gly Asp Ala Pro Leu Ser Pro Asp
 420 425 430

 Pro Leu Leu Ser Ser Pro Pro Gly Ser Pro Lys Ala Ala Leu His Ser
 435 440 445
 10
 Pro Val Ser Glu Gly Ala Pro Val Ile Pro Pro Ser Ser Gly Leu Pro
 450 455 460

 Leu Pro Thr Pro Asp Ala Arg Val Gly Ala Ser Thr Cys Gly Pro Pro
 465 470 475 480
 15
 Asp His Leu Leu Pro Pro Leu Gly Thr Pro Leu Pro Pro Asp Trp Val
 485 490 495

 Thr Leu Glu Gly Asp Phe Val Leu Met Leu Ala Ile Ser Pro Ser His
 500 505 510
 20
 Leu Gly Ala Asp Leu Val Ala Ala Pro His Ala Arg Phe Asp Asp Gly
 515 520 525

 Leu Val His Leu Cys Trp Val Arg Ser Gly Ile Ser Arg Ala Ala Leu
 530 535 540

 Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Arg Gly Ser His Phe Ser Leu Gly

Met Trp Trp Cys Cys Val Leu Phe Val Val Glu Cys Pro Arg Gly Leu
1 5 10 15

Leu Pro Arg Pro Cys Arg Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Gln Gly Gly
20 25 30

5 Lys Gly Lys Ala Leu Gln Leu Phe Gln Ser Arg Val Gln Pro Phe Leu
35 40 45

Glu Glu Ala Glu Ile Thr Phe Lys Leu Ile Leu Thr Glu Arg Lys Asn
50 55 60

10 His Ala Arg Glu Leu Val Cys Ala Glu Glu Leu Gly His Trp Asp Ala
65 70 75 80

Leu Ala Val Met Ser Gly Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly
85 90 95

15 Leu Met Glu Arg Pro Asp Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu Cys
100 105 110

Ser Leu Pro Gly Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Val Asn His
115 120 125

20 Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu Ile Asn Cys
130 135 140

Thr Leu Leu Leu Cys Arg Arg Arg Leu Ser Pro Met Asn Leu Leu Ser
145 150 155 160

Leu His Thr Ala Ser Gly Leu Arg Leu Tyr Ser Val Leu Ser Leu Ser
165 170 175

Trp Gly Phe Val Ala Asp Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Tyr Arg Arg
180 185 190

5 Leu Gly Glu Ile Arg Phe Thr Val Gly Thr Phe Phe Arg Leu Ala Ser
195 200 205

Leu Arg Ile Tyr Gln Gly Gln Leu Ala Tyr Leu Pro Val Gly Thr Val
210 215 220

10 Ala Ser Lys Arg Pro Ala Ser Thr Leu Val Gln Lys Gly Pro Val Asp
225 230 235 240

Thr His Leu Val Pro Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val
245 250 255

Val Pro Glu Gln Asp Phe Val Leu Val Leu Val Leu Leu His Thr His
260 265 270

15 Leu Ser Ser Glu Leu Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Glu Ala Gly
275 280 285

Val Met His Leu Phe Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Ala Leu
290 295 300

20 Leu Arg Leu Phe Leu Ala Met Gln Lys Gly Lys His Met Glu Leu Asp
305 310 315 320

Cys Pro Tyr Leu Val His Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu Pro
325 330 335

Arg Ser Gln Arg Gly Val Phe Ser Val Asp Gly Glu Leu Met Val Cys
340 345 350

5 Glu Ala Val Gln Gly Gln Val His Pro Asn Tyr Leu Trp Met Val Cys
 355 360 365

Gly Ser Arg Asp Ala Pro Ser Gly Arg Asp Ser Arg Arg Gly Pro Pro
370 375 380

Pro Glu Glu Pro
385



NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un ADN aislado y purificado que codifica una isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de mamífero.

2.- El ADN aislado y purificado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque codifica una isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de ratón.

10 3.- El ADN aislado y purificado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque codifica una isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de humano.

4.- El ADN aislado y purificado de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque codifica un péptido de 617 aminoácidos.

15 5.- El ADN aislado y purificado de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque codifica un péptido de 618 aminoácidos

6.- Una proteína codificada por el ADN que se reclama en la reivindicación 4.

20 7.- Una proteína codificada por el ADN que se reclama en la reivindicación 5.

8.- Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de SPHK2 de humano que consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 14.

9.- Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de SPHK2 de murino que consiste esencialmente de la SEQ ID NO: 12.

25 10.- Un ADN aislado y purificado que codifica un péptido de una isoforma de esfingosina cinasa tipo 2, dicho ADN comprendiendo una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la secuencia de acceso a Genbank No. bankit325787, y la secuencia de acceso a Genbak No. bankit325752.

11.- Una construcción de ADN recombinante que comprende: (a) un vector y (b) el ADN que se reclama en la reivindicación 2 o la reivindicación 4.

12.- Una construcción de ADN recombinante que comprende: (a) un vector, y (b) el ADN que se reclama en la reivindicación 3 o la reivindicación 5.

5 13.- La construcción de ADN recombinante de conformidad con la reivindicación 11, en donde dicho vector es un vector de expresión.

14.- La construcción de ADN recombinante de conformidad con la reivindicación 11, en donde dicho vector es un vector procariótico.

10 15.- La construcción de ADN recombinante de conformidad con la reivindicación 11, en donde dicho vector es un vector eucariótico.

16.- La construcción de ADN recombinante de conformidad con la reivindicación 12, en donde dicho vector es un vector de expresión.

17.- La construcción de ADN recombinante de conformidad con la reivindicación 12, en donde dicho vector es un vector procariótico.

15 18.- La construcción de ADN recombinante de conformidad con la reivindicación 12, en donde dicho vector es un vector eucariótico.

19.- Una célula hospedera transformada con la construcción de ADN recombinante que se reclama en la reivindicación 11.

20 20.- La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha célula es procariótica.

21.- La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 19, en donde dicha célula es eucariótica.

22.- Una célula hospedera transformada con la construcción de ADN recombinante que se reclama en la reivindicación 12.

25 23.- La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 22, en donde dicha célula es procariótica.

24.- La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 22, en donde dicha célula es eucariótica.

225

25.- Un método para producir un péptido de Isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de ratón, que comprende cultivar la célula hospedera que se reclama en la reivindicación 19, bajo condiciones tales que es expresado un ADN aislado de Isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de ratón, y dicho péptido de isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de ratón es producido en consecuencia.

26.- Un método para producir un péptido de isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de humano, que comprende cultivar la célula hospedera que se reclama en la reivindicación 22, bajo condiciones tales que es expresado un ADN aislado de isoforma de tipo 2 de esfingosina cinasa de humano, y dicho péptido de Isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 de humano es producido en consecuencia.

27.- Un método para detectar un agente o un fármaco que inhibe o promueve la actividad de esfingosina cinasa tipo 2, que comprende: (a) proveer en una célula una construcción de ADN recombinante como la que se reclama en la reivindicación 11, de tal manera que sea producida en dicha célula isoforma de esfingosina cinasa tipo 2; (b) agregar por lo menos un fármaco o agente a dicha célula, y (c) detectar si dicho fármaco o agente inhibe o promueve la actividad de esfingosina cinasa tipo 2 midiendo la fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en dichas células, y comparar la medición resultante con un control que no recibió dicho fármaco o agente, en donde una reducción en la cantidad de fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en comparación con el control, indica un fármaco o agente inhibidor; o un aumento en la cantidad de fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en dicha célula en comparación con el control, indica un agente o fármaco estimulador.

28.- Un método para detectar un agente o fármaco que inhibe o promueve la actividad de esfingosina cinasa tipo 2 que comprende: (a) proveer en una célula una construcción de ADN recombinante como la que se reclama en la reivindicación 12, de tal manera que sea producida en dicha célula Isoforma de esfingosina cinasa tipo 2; (b) agregar por lo menos un fármaco o agente a dicha

célula, y (c) detectar si dicho fármaco o agente inhibe o promueve la actividad de esfingosina cinasa tipo 2 midiendo la fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en dicha célula, y comparando la medición resultante con un control que no recibió dicho fármaco o agente, en donde una disminución en la cantidad de fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en comparación con el control, indica un fármaco o agente inhibidor, o un aumento en la cantidad de fosforilación de lípidos dependiente de esfingosina cinasa en dicha célula en comparación con el control, indica un fármaco o agente estimulador.

29.- Un agente o fármaco detectado por medio del método que se reclama en la reivindicación 27.

30.- Un agente o fármaco detectado por medio del método que se reclama en la reivindicación 28.

31.- Un método de regulación de un proceso biológico en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de la proteína que se reclama en la reivindicación 6 o la reivindicación 8.

32.- Un método de regulación de un proceso biológico en un mamífero, que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de la proteína que se reclama en la reivindicación 7 o la reivindicación 9.

33.- El método que se reclama en la reivindicación 31, en donde el proceso biológico se selecciona del grupo que consiste de mitogénesis, apoptosis, desarrollo neuronal, quimiotaxis, angiogénesis y respuestas inflamatorias.

34.- El método que se reclama en la reivindicación 31, en donde el proceso biológico es angiogénesis.

35.- El método que se reclama en la reivindicación 32, en donde el proceso biológico se selecciona del grupo que consiste de mitogénesis, apoptosis, desarrollo neuronal, quimiotaxis, angiogénesis y respuestas inflamatorias.

36.- El método que se reclama en la reivindicación 32, en donde el proceso biológico es angiogénesis.

37.- Un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de muerte celular incrementada o proliferación celular disminuida, que
5 comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de una proteína como la que se reclama en la reivindicación 6 o la reivindicación 8.

38.- Un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de muerte celular incrementada o proliferación celular disminuida, que
10 comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de una proteína como la que se reclama en la reivindicación 7 o la reivindicación 9.

39.- Un método para el tratamiento o manejo de una enfermedad que resulta de muerte celular disminuida o proliferación celular incrementada, que
15 comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo para una proteína como la que se reclama en la reivindicación 6 o la reivindicación 8.

40.- Un método para el tratamiento o manejo de una enfermedad que resulta de muerte celular disminuida o proliferación celular incrementada, que
20 comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo para una proteína como la que se reclama en la reivindicación 7 o la reivindicación 9.

41.- Un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de migración o motilidad anormal de células, seleccionada del grupo que
25 consiste de cáncer, restenosis y neuropatía diabética, el método comprendiendo administrar a un mamífero en necesidad del mismo, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo para una proteína como la que se reclama en la reivindicación 6 o la reivindicación 8.

42.- Un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de migración o motilidad anormal de células, seleccionada del grupo que consiste de cáncer, restenosis y neuropatía diabética, el método comprendiendo administrar a un mamífero en necesidad del mismo, una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo para una proteína como la que se reclama en la reivindicación 7 o la reivindicación 9.

43.- El método que se reclama en la reivindicación 41, en donde la enfermedad es cáncer.

44.- El método que se reclama en la reivindicación 42, en donde la enfermedad es cáncer.

45.- Una composición para el tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de muerte celular incrementada o proliferación celular disminuida, que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido como el que se reclama en la reivindicación 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

46.- Una composición para el tratamiento o alivio de una enfermedad que resulta de muerte celular incrementada o proliferación celular disminuida, que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido como el que se reclama en la reivindicación 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

47.- Un método para seleccionar agentes o fármacos que reducen o eliminan la actividad de esfingosina cinasa tipo 2, el método comprendiendo detectar una disminución de la actividad enzimática de esfingosina cinasa tipo 2 en presencia de dicho agente o fármaco.

48.- Un método para detectar la presencia de una isoforma de esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra, que comprende: (i) poner en contacto una muestra con anticuerpos que reconocen esfingosina cinasa tipo 2; y (ii) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado entre esfingosina cinasa tipo 2 y anticuerpos específicos para la misma.

49.- Un método para detectar esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra,

que comprende someter la muestra a una reacción en cadena de polimerasa y detectar la presencia de esfingosina cinasa tipo 2.

50.- Un equipo diagnóstico para detectar ARN/ADNc de esfingosina cinasa tipo 2 en una muestra, que comprende iniciadores o oligonucleótidos
5 específicos para ARN o ADNc de esfingosina cinasa tipo 2, adecuados para hibridación con ARN o ADNc de esfingosina cinasa tipo 2, y/o amplificación de secuencias de esfingosina cinasa tipo 2, y reactivos auxiliares adecuados.

RESUMEN DE LA INVENCION

Acidos nucleicos que codifican isoformas de esfingosina cinasa tipo 2 de ratón y humano, métodos para detectar agentes o fármacos que inhiben o
5 promueven la actividad de esfingosina, y agentes terapéuticos que contienen péptidos o anticuerpos para péptidos codificados por dichos ácidos nucleicos.



231

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 900176089-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 02089194 00000000 Folios: 231
Fecha (AMD): 2002-10-03 17:04:58
Trámite : 011 PCT-PATENT 279 FASE NNCI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 63,528
FECHA : SEPTIEMBRE 23 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2894482	23/09/2002	25,848,800.00

***** CONCEPTO *****

CANT. FENITIBICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Cob

13473-841-007-5