

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 532375

(P2003 - 532375A)

(43)公表日 平成15年11月5日(2003.11.5)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 7/00	J 2 G 0 4 5
A 6 1 K 7/00		7/075	4 B 0 2 4
7/075		45/00	4 B 0 5 0
38/48		A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 3
45/00		15/08	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 90数 ) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 520841(P2001 - 520841)

(86) (22)出願日 平成12年8月30日(2000.8.30)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月27日(2002.2.27)

(86)国際出願番号 PCT/US00/23823

(87)国際公開番号 W001/016293

(87)国際公開日 平成13年3月8日(2001.3.8)

(31)優先権主張番号 09/386,653

(32)優先日 平成11年8月31日(1999.8.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 オ-ソ - マクニール・フ-アマシユーチカル・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国ニュージャ-ジー州08869 - 0602ラリタン・ユー-スルートナンバー202

(72)発明者 ダロウ, アンドリユー・エル  
アメリカ合衆国、ペンシルバニア・19446、ランスデイル、トロクセル・ロード・83

(72)発明者 チ- , チエンセン  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャ-ジー・08876、プランチバ-グ、チャピワ・トレイル・7

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトセリンプロテアーゼTをコードするDNA

(57)【要約】

本明細書において、本発明者らは、本発明者らがプロテアーゼTと名付けた新規なセリンプロテアーゼをコードするcDNAの分子生物学的同定を記載する。推定されるアミノ酸配列は290アミノ酸のプレタンパク質形態をコードし、そして他の十分に特徴付けられているセリンプロテアーゼとのそのアラインメントにより、プロテアーゼTがS1セリンプロテアーゼファミリーのメンバーであることが示される。本発明者らは、プロテアーゼTのmRNAが、胃、精巣、網膜、繊維芽細胞、脊髄、および脳のいくつかの領域において発現していることを見出した。プロテアーゼTのmRNAはまた、白血球およびジャーカット(ATCC TIB-152)T細胞株においても見出される。従って、このプロテアーゼは、胃障害、精巣障害、網膜障害、皮膚科学的障害、神経学的/神経変性的障害および/または免疫学的障害に潜在的に関与している。プロテアーゼT遺伝子は、トリプターゼの遺伝子座に近いヒト染色体16p13.1にマッピングされる。本発明者らが作製した酵素的に活性なプロテアーゼTは、生理学的基質および特異的調節剤を同定するためのさらなる生化学的研究に供される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 プロテアーゼTをコードする単離および精製された核酸分子およびその機能的誘導体。

【請求項2】 配列番号1、配列番号8およびその機能的誘導体からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する、請求項1に記載の単離および精製された核酸分子。

【請求項3】 前記核酸分子が、cDNA、RNA、mRNAおよびゲノムDNAからなる群から選択される、請求項1に記載の単離および精製された核酸分子。

【請求項4】 プロテアーゼTタンパク質をコードする核酸配列およびその機能的誘導体を含有する発現ベクター。

【請求項5】 プロテアーゼTタンパク質をコードする核酸配列が、配列番号1、配列番号8およびその機能的誘導体からなる群から選択される、請求項4に記載の発現ベクター。

【請求項6】 前記核酸配列が、cDNA、RNAおよびゲノムDNAからなる群から選択される、請求項4に記載の発現ベクター。

【請求項7】 請求項4に記載の発現ベクターを含有する組換え宿主細胞。

【請求項8】 前記発現ベクターが、配列番号1、配列番号8およびその機能的誘導体からなる群から選択される核酸配列を含有する、請求項7に記載の組換え宿主細胞。

【請求項9】 前記核酸配列が、ゲノムDNA、RNAおよびcDNAからなる群から選択される、請求項7に記載の組換え宿主細胞。

【請求項10】 プロテアーゼTタンパク質として機能する実質的に純粋な形態のタンパク質。

【請求項11】 配列番号7、配列番号9およびその機能的誘導体からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項10に記載のタンパク質。

【請求項12】 プロテアーゼTタンパク質と免疫学的に反応し得る単一特異性抗体。

【請求項13】 前記タンパク質のプロテアーゼ活性を阻止する、請求項1

2に記載の抗体。

【請求項14】 組換え宿主細胞においてプロテアーゼTタンパク質を発現させるための方法であって、

(a) 請求項4に記載される発現ベクターを好適な宿主細胞にトランスフェクションすること；および

(b) 発現ベクターからのプロテアーゼTタンパク質の発現を可能にする条件のもとで工程(a)の宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項15】 プロテアーゼTタンパク質の活性を調節する化合物を同定する方法であって、

(a) プロテアーゼTタンパク質の活性の調節剤と、プロテアーゼTタンパク質と、標識された基質とを混合すること；および

(b) 標識された基質の変化を測定することを含む方法。

【請求項16】 標識された基質が、蛍光性、比色測定性、放射性および蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 請求項15に記載される方法において活性な化合物であって、プロテアーゼTセリンプロテアーゼ活性の調節剤である化合物。

【請求項18】 化合物がプロテアーゼTセリンプロテアーゼ活性のアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項17に記載の化合物。

【請求項19】 化合物がプロテアーゼTセリンプロテアーゼの発現調節剤である、請求項17に記載の化合物。

【請求項20】 プロテアーゼTによって媒介される状態に対するそのような処置を必要とする患者を処置する方法であって、請求項17に記載される化合物を投与することを含む方法。

【請求項21】 配列番号1および配列番号8よりなる群から選択される核酸配列と、配列番号7によるプロテアーゼTをコードする核酸配列と、それらのフラグメントとを含むキット。

【請求項22】 配列番号7および配列番号9ならびにそのフラグメントまたは誘導体からなる群から選択されるセリンプロテアーゼタンパク質を含むキット。

【請求項23】 請求項10に記載のタンパク質を含む薬学的組成物。

【請求項24】 組成物が局所的なスキンケア用組成物である、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項25】 請求項10に記載のタンパク質を含む非薬学的組成物。

【請求項26】 組成物が、洗濯用洗剤、シャンプー、ハード型表面洗浄用組成物および食器洗浄用組成物からなる群から選択される、請求項25に記載の非薬学的組成物。

【請求項27】 請求項24に記載される組成物を局所的に適用することを含む、落屑の平衡異常を処置する方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の背景)**

トリプシン/キモトリプシン様(S1)セリンプロテアーゼファミリーのメンバーは、不活性なチモーゲン前駆体のタンパク質分解活性による消化プロセスおよび調節的増幅カスケードを含む多数の異なる生理学的プロセスにおいて極めて重要な役割を果たしている。多くの場合、これらのカスケードに含まれるプロテアーゼの基質は、それ自体、「下流」のセリンプロテアーゼの不活性形態、すなわちチモーゲンである。セリンプロテアーゼによって媒介される調節のよく知られた例には、血液凝固(Davie他(1991)、*Biochemistry*、30:10363~70)、キニン形成(ProudおよびKaplan(1988)、*Ann. Rev. Immunol.* 6:49~83)および補体系(ReidおよびPorter(1981)、*Ann. Rev. Biochemistry*、50:433~464)が含まれる。これらのタンパク質分解経路が長い間知られているが、新規なセリンプロテアーゼ遺伝子およびそれらの産物の発見により、これらのカスケードの調節について我々は理解を高め、そして新規なプロテアーゼネットワークが解明されると考えられる。

**【0002】**

プロテアーゼは、洗濯用洗剤、食品加工、繊維加工およびスキンケア用製品を含む様々な商業目的のために非天然の環境で使用されている。洗濯用洗剤において、プロテアーゼは、溶解性が良くない有機化合物を、より容易に洗剤および水に溶解し得るより溶解性しやすい形態に分解するために用いられている。この能力より、プロテアーゼは「汚れ除去剤」として作用している。食品加工の例には、食肉を柔らかくすることおよびチーズ製造が含まれる。プロテアーゼは、例えば、繊維の収縮を防止するために、ウールを処理する繊維加工において使用されている。プロテアーゼは、落屑速度の平衡異常のために積み重なる皮膚表面の鱗屑を除くためにスキンケア用製品に含められることがある。これらの適用のいくつかにおいて汎用されるプロテアーゼは、それらの酵素を工業的に製造するために容易に増殖できる原核生物細胞または真核生物細胞に由来する。例えば、使用

される一般的な種は、米国特許第5,217,878号に記載されているようなバチルス属である。あるいは、米国特許第5,278,062号には、洗濯用洗剤組成物において使用される、真菌トリチラクウム・アルBUM (Tritirachium album) から単離されたセリンプロテアーゼが記載されている。残念なことに、いくつかのプロテアーゼは、過敏症のヒトがプロテアーゼがアレルギー反応を引き起こし得ることによって、または非天然の環境で使用したときに効力が低下することによって、その使用が制限されている。非ヒト起源に由来するプロテアーゼタンパク質は過敏症のヒトにおいて免疫応答をより誘導しやすいことが予想される。これらの制限のために、過敏症のヒトに対する免疫原性がほとんどなく、かつ/または非天然の環境で効率的なタンパク質分解活性を提供する代替プロテアーゼが求められている。組換え技術の出現により、工業的製造に好適な宿主において任意の種のタンパク質を発現させることが可能になっている。

#### 【0003】

##### (発明の開示)

本明細書において、本発明者らは、本発明者らがプロテアーゼTと名付けた新規なセリンプロテアーゼをコードするcDNAの分子生物学的同定を記載する。プロテアーゼTのcDNA配列により、290アミノ酸のプレプロプロテアーゼTポリペプチドが予測され、そして他の十分に知られているセリンプロテアーゼとのそのアラインメントにより、プロテアーゼTがS1セリンプロテアーゼファミリーのメンバーであることが明瞭に示される。

#### 【0004】

酵素的に活性なプロテアーゼTは、生理学的な基質および特異的な調節剤を同定するためのさらなる生化学的分析に供される。プロテアーゼTの調節剤は、免疫細胞機能(これに限定されない)を含む免疫系に関連する疾患の処置における治療剤として潜在的に有用である。さらに、精巢および胃だけでなく、脳の特定領域におけるプロテアーゼTの発現は、プロテアーゼT機能の調節剤を使用して、これらの組織傷害を処置できることを示唆している。精製されたプロテアーゼTは、洗浄剤、食品加工、繊維加工、洗濯用洗剤およびスキンケア用製品に対す

る組成物を配合するための成分として製造され得る。

【0005】

プロテアーゼTをコードする組換えDNA分子およびその一部は、そのようなDNA分子の相同染色体を単離するために、そのようなDNA分子のゲノム同等体を同定して単離するために、そしてそのようなDNA分子の変異型形態を同定、検出または単離するために有用である。

【0006】

(図面の簡単な説明)

図1 - 新規なプロテアーゼTのcDNAのヌクレオチド配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号7)を示す。

【0007】

図2 - 他のS1セリンプロテアーゼに対するプロテアーゼTのアミノ酸配列の系統樹を示す。

【0008】

図3 - PCRに基づく組織分布は、プロテアーゼTのmRNAが限定されていることを示している。ゲルのオートラジオグラムが、遊離プローブ(F.P.)から電気泳動後に分離される標識されたネステイドプローブのハイブリダイゼーションによって検出される、プロテアーゼTに特異的なPCR産物の位置とともに示されている。分析された組織および細胞株のcDNAライブラリーは示されている通りである。

【0009】

図4 - チモーゲン活性化構築物におけるプロテアーゼT触媒作用ドメインのヌクレオチド配列(配列番号8)およびアミノ鎖配列(配列番号9)を示す。

【0010】

図5 - 組換えプロテアーゼのPFEK-プロテアーゼT-6XHISのポリアクリルアミドゲル分析およびウエスタンブロット分析。クーマシーブリリアントブルーで染色された新規なセリンプロテアーゼPFEK-プロテアーゼT-6XHISサンプルを含むポリアクリルアミドゲルが示される(左側の1、2)。相対的な分子量がタンパク質標準品(M)の位置によって示される。示されたレー

ンにおいて、精製されたチモーゲン、チモーゲンをその活性型形態に切断して活性化するために使用されたEKによる未処理(-)または消化(+ )のいずれかであった。抗FLAGMoAbのM2でプローブされたゲルのウエスタンブロットもまた示される(右側の1、2)。これにより、発現し、精製されたチモーゲンが定量的に切断され、プロセッシングされた活性型プロテアーゼが生じていることが明らかにされる。FLAGエピトープはEKプロ配列のすぐ上流に存在するので、EKによる切断により、小さすぎてポリアクリルアミドゲルに保持され得ない、従って+EKレーンにおいて検出されないFLAG含有ポリペプチドが生じている。

#### 【0011】

図6 - 活性化構築物から発現、精製および活性化された組換えプロテアーゼT-6XHISの機能的なアミド分解活性を、発色性基質を使用して測定した。

#### 【0012】

表1 - 活性化された組換えプロテアーゼT-6XHISの比活性(nmol生成pNA/分/ugタンパク質)が、分析された様々な基質について測定されて示される。

#### 【0013】

発明の詳細な説明

(発明の背景)

定義

本明細書中で使用されている用語「タンパク質ドメイン」は、タンパク質のそれ以外の部分とは無関係な安定した三次元構造に折り畳まれ得るタンパク質の領域を示す。この構造により、酵素活性、別の分子に対する認識モチーフの作製を含む、タンパク質におけるドメイン機能に関連した特定の機能が維持され得るか、またはタンパク質が特定の環境に存在するために必要な構造的成分が提供され得る。タンパク質ドメインは、通常、タンパク質スーパーファミリー内および類似する機能を行う他のタンパク質スーパーファミリー内の両方においてタンパク質の進化論的に保存された領域である。

#### 【0014】

本明細書中で使用されている用語「タンパク質スーパーファミリー」は、その進化論的關係が完全に確立されていなくてもよいが、または受け入れられる系統発生的基準によって離れていてもよいが、類似する三次元構造を示すか、または重要なアミノ酸の特徴的なコンセンサスを示すタンパク質を示す。本明細書中で使用されている用語「タンパク質ファミリー」は、受け入れられる系統発生的基準によってその進化論的關係が確立されているタンパク質を示す。

#### 【0015】

本明細書中で使用されている用語「融合タンパク質」は、ドメインまたはリンカー領域の組み合わせられた機能の機能を得るために、多数のタンパク質ドメインまたはリンカー領域を組み合わせさせた結果であるタンパク質構築物を示す。これは、非常に多くの場合、所望するタンパク質をコードする新しいポリヌクレオチド配列を作製するためにヌクレオチド配列を分子クローニングすることによって達成される。あるいは、融合タンパク質の作製は、2つのタンパク質を化学的に結びつけることによって達成され得る。

#### 【0016】

本明細書中で使用されている用語「リンカー領域」または用語「リンカードメイン」または類似するそのような説明的用語は、クローニングベクターまたは融合タンパク質の構築において使用されるポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の部分を示す。リンカー領域の機能には、クローニング部位をヌクレオチド配列に導入すること、柔軟性の構成要素または間隔作製領域を2つのタンパク質ドメイン間に導入すること、あるいは特異的な分子相互作用のためにアフィニティー標識を作製することを含むことができる。リンカー領域は、特定の目的を伴うことなく融合タンパク質内に導入され得るが、クローニング時に行われた様々な選択から生じる。

#### 【0017】

本明細書中で使用されている用語「プレ配列」は、分泌シグナルのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を示す。非常に様々なそのような分泌シグナル配列が当業者には知られており、本発明における使用に好適である。好適なプレ配列の例には、プロラクチンFLAG、トリプシノーゲンおよびキモFLAGが

含まれるが、これらに限定されない。

【0018】

本明細書中で使用されている用語「プロ配列」は、制限プロテアーゼに対する切断部位をコードするヌクレオチド配列を示す。制限プロテアーゼに対する非常に様々な切断部位が当業者には知られており、本発明における使用に好適である。好適なプロ配列の例には、EK、FXaおよびトロンビンが含まれるが、これらに限定されない。

【0019】

本明細書中で使用されている用語「クローニング部位」または用語「ポリクローニング部位」は、クローニングベクター内に含まれるか、あるいは1つまたは2つ以上の利用可能な制限エンドヌクレアーゼのコンセンサス配列を有する融合タンパク質内において操作されたヌクレオチド配列の領域を示す。正しく選ばれた制限エンドヌクレアーゼを使用することにより、転写および翻訳の後で所望するタンパク質生成物をもたらす、開始コドンに対して読み枠が合った配列をコードする所望のヌクレオチド配列を単離することができる。これらのヌクレオチド配列は、その後、他のクローニングベクターに導入することができ、または新規な融合タンパク質を作製するために使用することができ、または特異的な部位特異的変異を導入するために使用することができる。クローニング部位は、サイレント変異、保存的な変異、または所望する制限酵素コンセンサス配列を含むリンカー領域の導入によって所望する位置で操作され得ることが当業者によって十分に理解されている。クローニング部位の正確な位置は、クローン化されているタンパク質またはそのフラグメントの所望する機能が維持される限り柔軟であり得ることもまた当業者によって十分に理解されている。

【0020】

本明細書中で使用されている用語「標識」は、標識を含む融合タンパク質の単離、精製または検出を容易にするアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を示す。非常に様々なそのような標識が当業者には知られており、本発明における使用に好適である。好適な標識には、HA標識、His標識、ビオチン、アビジンおよび抗体結合部位が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0021】

本明細書中で使用されている「発現ベクター」は、適切な宿主細胞における遺伝子のクローン化体の転写およびそのmRNAの翻訳のために必要とされるDNA配列として本明細書中では定義される。そのようなベクターは、大腸菌を含む細菌、らん藻、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞を含む真菌細胞、および動物細胞などの様々な宿主において真核生物の遺伝子を発現させるために使用することができる。

## 【0022】

本明細書中で使用されている用語「触媒作用ドメインカセット」は、目的とするセリンプロテアーゼの触媒作用ドメインを少なくともコードするアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を示す。ヌクレオチド配列が単離されると、非常に様々なプロテアーゼ触媒作用ドメインは、当業者に現在知られている発現ベクター、ならびにそれをコードする単離されたヌクレオチド配列を未だ有していない発現ベクターを含む本発明の発現ベクターに挿入することができる。

## 【0023】

本明細書中で使用されている、ヌクレオチド配列、ベクターまたはポリペプチドの「機能的誘導体」は、本明細書中に記載される性質に実質的に類似する生物学的活性（機能的または構造的のいずれか）を有する。用語「機能的誘導体」は、ヌクレオチド配列、ベクターまたはポリペプチドの「フラグメント」、「変化体」、「縮重変化体」、「アナログ」および「ホモログ」を含むものとする。用語「フラグメント」は、発現させたチモーゲン前駆体を活性化するために使用されるプレ配列およびプロ配列として記載されるモジュールの任意のヌクレオチド配列サブセット、ベクターサブセットまたはポリペプチドサブセットを示すことが意味される。用語「変化体」は、核酸配列全体もしくはコードされるタンパク質に対して、またはフラグメントに対して、いずれかで構造および機能が実質的に類似しているヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を示すことが意味される。核酸配列またはアミノ酸配列は、2つの分子が類似する構造的特徴を有する場合、または2つの分子が類似する生物学的性質を有する場合に互いに「実質的に類似」している。従って、2つの分子が実質的に類似する活性を有する場合、その

2つの分子は、一方の分子の構造がもう一方に見出されない場合でさえ、または2つのアミノ酸配列が同一でない場合でさえ、変化体であると見なされる。用語「アナログ」は、別の関連するタンパク質に対して機能が実質的に類似しているタンパク質分子を示す。

#### 【0024】

本明細書中において、本発明者らは、食道組織から分子的にクローン化され、プロテアーゼTと名付けられた新規なセリンプロテアーゼを記載する。GenbankデータベースのFastA検索により、プロテアーゼTは、ラットの海馬からクローン化され、BSP2と呼ばれる以前に特徴付けられた部分的なセリンプロテアーゼcDNA(Davies他(1998)、J. Biol. Chem. 273:23004~11)に対して最も大きな類似性を有することが示される[284アミノ酸のにおいて48.2%の同一性]。他の発表されたヒトセリンプロテアーゼは、プロスタチン(Yu他(1996)、Genomics、32:334~40)[281アミノ酸において43.8%の同一性]およびトリプターゼ(Miller他(1990)、J. Clin. Invest. 86:864~700)[274アミノ酸において43.8%の同一性]である。プロテアーゼTのヌクレオチド配列を用いたGenbankデータベースのさらなる相同性検索により、染色体16p13.1にマッピングされているヒトコスミドクローン(400D1、Genbankアクセション番号AC004036)の非連続領域との相同性が明らかにされた。Genbankアクセション番号AC004036の注釈に記載される提案されたイントロン/エキソン接合部から連続したヌクレオチド配列を組み立てることにより、より短く、そしてまた非連続であり、従って本発明のプロテアーゼTとは実質的に異なる核酸配列が作製される。従って、Genbankアクセション番号AC004036の注釈に示されたエキソンは正しくないと考えられる。従って、本発明のプロテアーゼTは、以前には記載されていないプロテアーゼを表す。本発明の以前には記載されていない配列の使用により、染色体16p13.3はプロテアーゼT遺伝子の正しい位置であることが示される。本発明者らは、プロテアーゼTのmRNAを胃および精巢および白血球およびジャーカット(ATCC TIB-152)T細胞株に

において検出した。さらに、このセリンプロテアーゼのmRNAが、脊髄、および脳の多くの亜区において見出された。従って、プロテアーゼT、または化学的調節剤によるこの酵素の調節は、男性不妊症、免疫機能障害またはある種の神経学的障害を処置するために有用であり得る。プロテアーゼTはヒト宿主に由来するので、過敏症のヒトにおいて免疫原反応またはアレルギー反応を誘導する可能性は少なく、従って、プロテアーゼTはまた、洗浄剤、食品加工、繊維加工、洗濯用洗剤およびスキンケア用製品のための組成物を配合するためにも有用であり得る。

#### 【0025】

本発明は、食道組織から単離されたポリA RNAを使用して構築されたcDNAライブラリーから同定されたセリンプロテアーゼTをコードするDNAに関する。本明細書中で使用されているプロテアーゼTは、プロテアーゼとして特異的に機能し得るコードされるタンパク質生成物をいう。

#### 【0026】

プロテアーゼTの完全なアミノ酸配列は以前には知られておらず、またはプロテアーゼTをコードする完全なヌクレオチド配列は知られていなかった。これは、プロテアーゼTをコードする全長のDNA分子をクローニングした最初の報告である。mRNAの分布に基づいて、限られた数の組織および細胞タイプが記載されたプロテアーゼを含むことが予測される。プロテアーゼTを産生し得るヒト細胞株には、繊維芽細胞およびジャーカットが含まれるが、これらに限定されない。他の組織タイプは、ヒト網膜白血球、胃、精巣、脊髄、および脳の多くの亜区であり得る。

#### 【0027】

他の細胞および細胞株もまた、プロテアーゼTのcDNAを単離するために使用することに関して好適であり得る。好適な細胞の選択は、調整した細胞培地におけるプロテアーゼTのタンパク質分解活性をスクリーニングすることによって行うことができる。このアッセイにおいてプロテアーゼTのタンパク質分解活性を有する細胞タイプは、プロテアーゼTのDNAまたはmRNAを単離するために好適であり得る。

## 【0028】

この分野で知られている様々な手順はいずれも、プロテアーゼTのDNAを分子クローニングするために使用することができる。これらの方法には、プロテアーゼTを含有するcDNAライブラリーを適切な発現ベクターシステムで構築した後におけるプロテアーゼ遺伝子の直接的な機能的発現が含まれるが、これに限定されない。別の方法は、バクテリオファージまたはプラスミドのシャトルベクターにおいて構築されたプロテアーゼT含有cDNAライブラリーを、プロテアーゼT DNAのアミノ酸配列から設計された標識オリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングすることである。さらなる方法は、バクテリオファージまたはプラスミドのシャトルベクターにおいて構築されたプロテアーゼT含有cDNAライブラリーを、プロテアーゼTタンパク質をコードする部分cDNAを用いてスクリーニングすることからなる。この部分cDNAは、精製されたプロテアーゼTタンパク質のアミノ酸配列に由来する縮重オリゴヌクレオチドプライマーを設計することにより、プロテアーゼTのDNAフラグメントの特異的なポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅によって得られる。核酸データベースの相同性検索によって同定される様々な発現配列標識(EST)(Altschul他(1990)、J. Mol. Biol. 215:403~10; PearsonおよびLipman(1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444~8)もまたこの目的に利用することができる。この特定のプロテアーゼは、高度に保存された残基およびモチーフを含む多重遺伝子ファミリーのメンバーである。従って、低ストリンジェンシーのもとでcDNAライブラリーをスクリーニングして、関連するが、同一でない相同的なcDNAを同定することが可能である。より近年においては、所与の細胞タイプのRNAから逆転写されたcDNAの縮重したオリゴヌクレオチドを使用する直接的なPCRは、目的とする新規な関連cDNAを単離するための有益な方法である。あるいは、全長のcDNA配列は、その配列が公表されると、完全なコード配列に隣接して一致するオリゴヌクレオチドプライマーを設計することにより特異的なPCR増幅によって得ることができる。

## 【0029】

別の方法は、プロテアーゼT産生細胞からRNAを単離し、そしてRNAをタンパク質にインビトロ翻訳システムまたはインビボ翻訳システムによって翻訳することである。RNAのタンパク質への翻訳により、例えば、抗プロテアーゼT抗体との免疫学反応性によって同定され得るプロテアーゼTタンパク質の少なくとも一部が産生される。完全な触媒作用ドメインが翻訳される場合、プロテアーゼTタンパク質の機能的なタンパク質分解活性を使用して、プロテアーゼTのmRNAを含有するRNA画分を同定することができる。この方法において、プロテアーゼT産生細胞から単離されたRNAのプールを、プロテアーゼTタンパク質の少なくとも一部をコードするRNAの存在について分析することができる。RNAプールのさらなる分画化を、プロテアーゼTのRNAをプロテアーゼTでないRNAから精製するために行うことができる。

#### 【0030】

この方法によって作製されるペプチドまたはタンパク質は、アミノ酸配列を得るために分析することができる。その後、そのアミノ酸配列は、プロテアーゼTのcDNAを作製するためのプライマーを得るために使用することができる。同様に、翻訳に使用されるRNAは、ヌクレオチド配列を得るために分析ことができ、そしてプロテアーゼTのcDNAを作製するためのプローブを作製するために使用することができる。この方法はこの分野では知られており、例えば、Maniatis他(1989)、1~1626に見出され得る。

#### 【0031】

他のタイプのライブラリーは、他の細胞または細胞タイプから構築されたライブラリーと同様に、プロテアーゼTをコードするDNAを単離するために有用であり得ることが当業者には容易に明らかである。他のタイプのライブラリーには、非ヒト生物に由来する他の細胞から得られるcDNAライブラリー、ならびにYAC(酵母人工染色体)を含むゲノムライブラリー、およびコスミドライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0032】

好適なcDNAライブラリーは、プロテアーゼTのタンパク質分解活性を有する細胞または細胞株から調製され得ることが当業者には容易に明らかである。c

DNAライブラリーを調製して、プロテアーゼTのcDNAを単離する際に使用される細胞または細胞株の選択は、プロテアーゼTに関連する生物学的活性またはプロテアーゼTに特異的な免疫学的反応性を使用して、細胞に結合したプロテアーゼTのタンパク質分解活性を最初に測定することによって行うことができる。

#### 【0033】

cDNAライブラリーの調製は、この分野で十分に知られている標準的な技術によって行うことができる。よく知られているcDNAライブラリー構築技術は、例えば、Maniatis他(1989)、1~1626に見出され得る。

#### 【0034】

プロテアーゼTをコードするDNAは好適なゲノムDNAライブラリーからも単離され得ることもまた当業者には容易に明かである。ゲノムDNAライブラリーの構築は、この分野で十分に知られている標準的な技術によって行うことができる。よく知られているゲノムDNAライブラリー技術は、例えば、Maniatis他(1989)、1~1626に見出され得る。

#### 【0035】

プロテアーゼT遺伝子を上記の方法によってクローンするためには、プロテアーゼTのアミノ酸配列が必要になることがある。これを達成するために、プロテアーゼTタンパク質を精製して、部分アミノ酸配列を自動配列決定装置によって決定することができる。完全なアミノ酸配列を決定することは必ずしも必要ではないが、タンパク質に由来する6アミノ酸~8アミノ酸の2つの領域の一次配列が、部分的なプロテアーゼTのDNAフラグメントをPCR増幅するためのプライマーを作製するために決定される。あるいは、より長い縮重したオリゴヌクレオチドプローブを、決定されたアミノ酸配列のより長い連続した部分を用いて合成することができる。このオリゴヌクレオチドプローブは、好適なcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーを好適なストリンジェンシーのもとでスクリーニングして、プロテアーゼTに対応するDNAを単離するために標識して使用することができる。

#### 【0036】

好適なアミノ酸配列が同定されると、それらをコードし得るDNA配列が合成される。遺伝暗号は縮重しているため、2つ以上のコドンで、特定のアミノ酸をコードするために使用することができ、従って、アミノ鎖配列は、類似するDNAオリゴヌクレオチドの集合のいずれかによってコードされ得る。そのような集合の構成体の1つだけがプロテアーゼTの配列と同一であるが、これは、ミスマッチを有するDNAオリゴヌクレオチドの存在下でさえ、プロテアーゼTのDNAにハイブリダイゼーションし得る。ミスマッチしたDNAオリゴヌクレオチドは、プロテアーゼTのDNAに依然として十分にハイブリダイゼーションすることができ、プロテアーゼTをコードするDNAの同定および単離を可能にする。これらの方法によって単離されたDNAは、無脊椎動物起源および脊椎動物起源の様々な細胞タイプに由来するDNAライブラリーをスクリーニングするために、そして相同的な遺伝子を単離するために使用することができる。

#### 【0037】

精製された生物学的に活性なプロテアーゼTは様々な異なる物理的形態を有し得る。プロテアーゼTは、未成熟またはプロセッシングされていない全長のポリペプチドとして、あるいは部分的にプロセッシングされたポリペプチドとして、あるいはプロセッシングされたポリペプチドの組合せとして存在し得る。未成熟の全長型プロテアーゼTポリペプチドは、特異的タンパク質分解的切断事象によって翻訳後修飾され得ることがあり、これにより、未成熟の全長型ポリペプチドのフラグメントの形成がもたらされる。フラグメントまたはフラグメントの物理的会合は、プロテアーゼTに関連する完全な生物学的活性を有し得るが、プロテアーゼT活性の大きさは、個々のプロテアーゼTフラグメントおよび物理的に会合したプロテアーゼTポリペプチドフラグメントの間では異なり得る。

#### 【0038】

本明細書中に記載された方法によって得られるクローン化されたプロテアーゼTのDNAは、好適なプロモーターおよび他の適切な転写調節エレメントを含む発現ベクターに分子クローニングすることによって組換え発現させることができ、そして原核生物または真核生物の宿主細胞に移して、組換えプロテアーゼTタンパク質を製造することができる。そのような操作に関する技術は、Mania

t i s 他 ( 1 9 8 9 ) 、 1 ~ 1 6 2 6 に 詳 しく 記 載 さ れ て お り 、 こ の 分 野 で は 十 分 に 知 ら れ て い る。

【 0 0 3 9 】

発現ベクターは、適切な宿主における遺伝子のクローン化体の転写およびその mRNA の翻訳のために必要とされる DNA 配列として本明細書中では定義される。そのようなベクターは、大腸菌を含む細菌、らん藻、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞を含む真菌細胞、および動物細胞を含む様々な宿主において真核生物の遺伝子を発現させるために使用することができる。

【 0 0 4 0 】

特に設計されたベクターは、細菌 - 酵母または細菌 - 動物細胞または細菌 - 真菌細胞または細菌 - 無脊椎動物細胞などの宿主間における DNA 移動を可能にする。適切に構築された発現ベクターは、宿主細胞において自律的な複製に必要な複製起点、選択マーカー、限られた数の有用な制限酵素部位、高コピー数に対する能力、および活性なプロモーターを含むことが望ましい。プロモーターは、RNA ポリメラーゼに、DNA に結合させて、DNA 合成を開始させる DNA 配列として定義される。強力なプロモーターは、mRNA を高頻度で開始させるプロモーターである。発現ベクターには、クローニングベクター、改変されたクローニングベクター、特に設計されたプラスミドまたはウイルスが含まれ得るが、これらに限定されない。

【 0 0 4 1 】

様々な哺乳動物発現ベクターを、組換えプロテアーゼ T を哺乳動物細胞において発現させるために使用することができる。組換えタンパク質の発現に好適であり得る市販の哺乳動物発現ベクターには、pCINeo (Promega, Madison, WI, Madison, WI)、pMAMneo (Clontech, Palo Alto, CA)、pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA)、pMC1neo (Stratagene, La Jolla, CA)、pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA)、pSG5 (Stratagene, La Jolla, CA)、EBO-pSV2-neo (ATCC37593)、pBPV-1(8-2) (ATCC37

110)、pdBPV-MMTneo(342-12)(ATCC37224)、pRSVgpt(ATCC37199)、pRSVneo(ATCC37198)、pSV2-dhfr(ATCC37146)、pUCTag(ATCC37460)および1ZD35(ATCC37565)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0042】

様々な細菌発現ベクターを、組換えプロテアーゼTを細菌細胞において発現させるために使用することができる。組換えタンパク質の発現に好適であり得る市販の細菌発現ベクターには、pETベクター(Novagen, Inc., Madison, WI)およびpQEベクター(Qiagen, Valencia, CA)、pGEX(Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0043】

様々な真菌細胞発現ベクターを、組換えプロテアーゼTを酵母などの真菌細胞において発現させるために使用することができる。組換えプロテアーゼTの発現に好適であり得る市販の真菌細胞発現ベクターには、pYES2(InVitrogen, San Diego, CA)およびピキア(Pichia)発現ベクター(InVitrogen, San Diego, CA)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0044】

様々な昆虫細胞発現システムを、組換えプロテアーゼTを昆虫細胞において発現させるために使用することができる。Sf9細胞における組換えタンパク質の発現のために組換えバキュロウイルスを作製するために好適であり得る市販のバキュロウイルス移入ベクターには、pFastBac1(Life Technologies, Gaithersburg, MD)、pAcSG2(PharMingen, San Diego, CA)、pBlueBacII(InVitrogen, San Diego, CA)が含まれるが、これらに限定されない。さらに、ショウジョウバエ(Drosophila)シュナイダー(Schneider)株2(S2)細胞における組換えタンパク質の発現を可能にする

一群の昆虫細胞ベクターもまた利用することができる (Invitrogen、San Diego、CA)。

#### 【0045】

プロテアーゼTをコードするDNAは、組換え宿主細胞における発現のために発現ベクターにサブクロニングすることができる。組換え宿主細胞は原核生物性または真核生物性であり得る。これには、大腸菌などの細菌、酵母などの真菌細胞、哺乳動物細胞 (ヒト、ウシ、ブタ、サルおよび齧歯類を起源とする細胞株 (これに限定されない) を含む)、および昆虫細胞 (ショウジョウバエS2 (ATCC CRL-1963) およびカイコSf9 (ATCC CRL-1711) (これらに限定されない) に由来する細胞株を含む) が含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物種に由来する、好適であり得る市販の細胞株には、CV-1 (ATCC CCL70)、COS-1 (ATCC CRL1650)、COS-7 (ATCC CRL1651)、CHO-K1 (ATCC CCL61)、3T3 (ATCC CCL92)、NIH/3T3 (ATCC CRL1658)、HeLa (ATCC CCL2)、C127I (ATCC CRL1616)、BS-C-1 (ATCC CCL26)、MRC-5 (ATCC CCL171)、L細胞、およびHEK-293 (ATCC CRL1573) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0046】

発現ベクターは、形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合、リポフェクションおよびエレクトロポレーション (これらに限定されない) を含む多数の技術のいずれか1つによって宿主細胞に導入することができる。発現ベクターを含有する細胞は、細胞がプロテアーゼTタンパク質を産生するかどうかを明らかにするためにクローン増殖され、そして個々に分析される。プロテアーゼESOを発現する宿主細胞クローンの同定は、抗プロテアーゼT抗体との免疫学的反応性、および宿主細胞に結合したプロテアーゼTのタンパク質分解活性 (これらに限定されない) を含むいくつかの手段によって行うことができる。

#### 【0047】

プロテアーゼTのDNAの発現はまた、インビトロで産生された合成mRNA

を使用して行うことができる。合成mRNA、またはプロテアーゼT産生細胞から単離されたmRNAは、カエル卵母細胞への顕微注入（これに限定されない）を含む細胞型システムで効率的に翻訳されるだけでなく、コムギ胚芽抽出物および網状赤血球抽出物（これらに限定されない）を含む様々な無細胞システムで効率的に翻訳され得るが、カエル卵母細胞への顕微注入が一般に好ましい。

#### 【0048】

プロテアーゼTのタンパク質分解活性および/またはプロテアーゼTタンパク質の最適なレベルをもたらすプロテアーゼTのDNA配列を決定するために、下記（これらに限定されない）を含むプロテアーゼTのDNA分子を構築することができる：塩基36付近からほぼ塩基905付近（これらの数字は最初のメチオニンの最初のヌクレオチドおよび最初の停止コドンの前の最後のヌクレオチドに対応する；図1）までの30kDaタンパク質をコードするプロテアーゼT cDNAの全長のオープンリーディングフレーム、およびプロテアーゼTプロテアーゼをコードするcDNAの様々な一部を含有するいくつかの構築物。すべての構築物は、プロテアーゼT cDNAの5'非翻訳領域および3'非翻訳領域を全く含まないように、あるいはそれらのすべてまたは一部を含むように設計することができる。プロテアーゼTの活性およびタンパク質の発現レベルは、適切な宿主細胞にこれらの構築物を個々に、そして組み合わせて導入した後に測定することができる。一過性アッセイで最適な発現をもたらすプロテアーゼTのDNAカセットを決定した後、プロテアーゼTのこのDNA構築物は、哺乳動物細胞、バキュロウイルス感染昆虫細胞、大腸菌および酵母*S. cerevisiae*（これらに限定されない）を含む宿主細胞における発現のために様々な発現ベクターに移される。

#### 【0049】

宿主細胞のトランスフェクション体および顕微注入された卵母細胞は、プロテアーゼTのタンパク質分解活性のレベルおよびプロテアーゼTタンパク質のレベルの両方を下記の方法に従ってアッセイするために使用することができる。組換え宿主細胞の場合、これは、1つまたは2つ以上のフラグメントまたはサブユニットをコードするプロテアーゼTのDNAを含む1つのプラスミドまたは可能で

あれば2つ以上のプラスミドを同時にトランスフェクションすることを伴う。卵母細胞の場合、これは、プロテアーゼTをコードする合成RNAを同時に注入することを伴う。発現させるための適切な時間の後、細胞タンパク質が、例えば、<sup>35</sup>S-メチオニンで24時間にわたって代謝的に標識され、その後、細胞溶解物および細胞培養上清が集められ、プロテアーゼTタンパク質に対するポリクローナル抗体による免疫沈殿に供される。

#### 【0050】

プロテアーゼTの発現を明らかにする他の方法は、プロテアーゼT cDNAでトランスフェクションされた全細胞またはプロテアーゼTのmRNAが注入された卵母細胞におけるプロテアーゼTのタンパク質分解活性を直接的に測定することを伴う。タンパク質分解活性は、発色性基質または蛍光性基質の加水分解により調整培地または細胞溶解物を分析することによって測定することができる。プロテアーゼTを発現する組換え宿主細胞の場合、より高レベルの基質加水分解が、モック(mock)トランスフェクション細胞、すなわち、プロテアーゼTのDNA挿入物を有しない発現ベクターでトランスフェクションされた細胞に対して観測される。卵母細胞の場合、プロテアーゼTをコードするRNAが注入された卵母細胞に由来する溶解物または調整培地は、無関係のRNAで処理されたそのような卵母細胞よりも高いレベルの基質加水分解を示す。

#### 【0051】

タンパク質分解活性を測定する他の方法には、放射能標識されたタンパク質のタンパク質分解的な分解産物を測定すること(Coolican他(1986)、J. Biol. Chem. 261:4170~6)、分解されたタンパク質基質の蛍光測定的分析(Loneragan他(1995)、J. Food. Sci. 60:72~3、78; Twining(1984)、Anal. Biochem. 143:30~4)または比色分析(Buroker-KilgoreおよびWang(1993)、Anal. Biochem. 208:387~92)(これらに限定されない)が含まれる。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後のザイモグラフィ(WadstroemおよびSmyth(1973)、Sci. Tools、20:17~21)、ならびに蛍光共鳴エネルギー移動(

FRET)に基づく方法によるザイモグラフィ( NgおよびAuld(1989)、Anal. Biochem. 183:50~6)もまた、タンパク質分解活性を測定するために使用される方法である。

#### 【0052】

宿主細胞におけるプロテアーゼTタンパク質のレベルは免疫親和性によって定量することができる。プロテアーゼTに特異的な親和性ビーズまたはプロテアーゼTに特異的な抗体が、例えば、<sup>35</sup>S-メチオンで標識されたプロテアーゼTタンパク質または未標識のプロテアーゼTタンパク質を単離するために使用される。標識されたプロテアーゼTタンパク質はSDS-PAGEによって分析される。未標識のプロテアーゼTタンパク質は、プロテアーゼTに特異的な抗体を用いて、ウエスタンブロッティングアッセイ、ELISAアッセイまたはRIAアッセイによって検出される。

#### 【0053】

遺伝暗号は縮重しているので、2つ以上のコドンで、特定のアミノ酸をコードするために使用することができ、従って、アミノ鎖配列は、類似するDNAオリゴヌクレオチドの集合のいずれかによってコードされ得る。そのような集合の構成体の1つだけがプロテアーゼTの配列と同一であるが、これは、ミスマッチを有するDNAオリゴヌクレオチドの存在下でさえ、プロテアーゼTのDNAにハイブリダイゼーションすることができる。代わりの条件のもとでは、ミスマッチしたDNAオリゴヌクレオチドは、プロテアーゼTのDNAに依然としてハイブリダイゼーションすることができ、プロテアーゼTをコードするDNAの同定および単離を可能にする。

#### 【0054】

特定の生物に由来するプロテアーゼTをコードするDNAは、プロテアーゼTのDNAのホモログを他の生物から単離して精製するために使用することができる。これを達成するために、最初のプロテアーゼTのDNAが、プロテアーゼTのホモログをコードするDNAを含有するサンプルと適切なハイブリダイゼーション条件のもとで混合され得る。ハイブリダイゼーションしたDNA複合体を単離することができ、そしてホモログDNAをコードするDNAをその複合体から

精製することができる。

【0055】

特定のアミノ酸をコードする様々なコドンには相当量の冗長性が存在することが知られている。従って、本発明はまた、同一アミノ酸の最終的な翻訳体をコードする別のコドンを含むそのようなDNA配列に関する。本明細書のために、1つまたは2つ以上の置き換えられたコドンを有する配列は、縮重変化体として定義される。また、本発明の範囲内には、発現タンパク質の最終的な物理的性質を実質的に変化させない、DNA配列または翻訳タンパク質のいずれかにおける様々な変異も含まれる。例えば、ロイシンのバリンへの置換、またはリシンのアルギニンへの置換、またはグルタミンのアスパラギンへの置換は、ポリペプチドの機能性における変化を生じさせない。

【0056】

ペプチドをコードするDNA配列を変化させて、天然に存在するペプチドの性質とは異なる性質を有するペプチドをコードし得るようにすることが知られている。DNA配列を変化させる方法には、部位特異的変異誘発法が含まれるが、これに限定されない。変化させた性質の例には、基質に対する酵素の親和性またはリガンドに対する受容体の親和性における変化が含まれるが、これらに限定されない。

【0057】

いくつかの組換えセリンプロテアーゼ精製手順を利用することが、これらは好適に使用することができる(Hansson他(1994)、J. Biol. Chem. 269:19420~6; Little他(1997)、J. Biol. Chem. 272:25135~25142; Takayama他(1977)、J. Biol. Chem. 272:21582~21588; Yamaoka他(1998)、J. Biol. Chem. 273:11895~11901)。天然源からプロテアーゼTを精製するために上記に記載されているように、組換えプロテアーゼTは、塩分画化、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト吸着クロマトグラフィーおよび疎水性相互作用クロマトグラフィーの様々な組合せによって、またはそれらを個

々に適用することによって、細胞溶解物および抽出物から、または調整培養培地から精製することができる。S1セリンプロテアーゼファミリーの多くのメンバーの場合と同様に、プロテアーゼTを組換え宿主細胞において発現させた後、プロテアーゼTは、タンパク質分解活性体にするために限定的なタンパク質分解を必要とし得る不活性なチモーゲン前駆体として回収することができる。

#### 【0058】

全長型セリンプロテアーゼcDNAを生化学的分析および酵素的分析のために発現させる際の大きな欠点は、多量の不活性なチモーゲンが産生する可能性が非常に大きいということである。このようなチモーゲン前駆体は、顕著なタンパク質分解活性をほとんど有していないことが多く、従って、現在利用できる2つの方法のいずれかによって活性化しなければならない。1つの方法は、均一に精製されたタンパク質調節物において正しい環境条件のもとで行われ得る自己活性化によるものである(Little他(1997)、J. Biol. Chem. 272:25135~25142)。研究者は、大きなタンパク質濃度を必要とすることが多いこれらの条件を厳密に評価しなければならない。第2の方法は、トリプシンなどの代理的な活性化プロテアーゼを使用して、研究中のセリンプロテアーゼを切断し、そして活性化後に混入プロテアーゼを不活性化すること(Takayama他(1997)、J. Biol. Chem. 272:21582~21588)、または活性化後に混入プロテアーゼを物理的に除くことである(Hansson他(1994)、J. Biol. Chem. 269:19420~6)。しかし、両方の方法では、不十分な活性化あるいは分解またはサンプル喪失をもたらす過度な消化がこれらの活性化技術で常に起こりうる結果であるので、正確な条件を経験的に確立しなければならず、そして活性化反応を注意深くモニターしなければならない。S1セリンプロテアーゼファミリーのメンバーを研究している研究者は、細菌(Wang他(1995)、Biol. Chem. Hoppe-Seyler、376:681~4)および哺乳動物細胞(Yamashiro他(1997)、Biochim. Biophys. Acta、1350:11~14)において発現させたチモーゲンの活性化について制限プロテイナーゼの使用を利用している。1つの報告において、著者は、*Pichia*

p a s t r i s 発現システムにおいて内因性の酵母 K E X 2 シグナルペプチダーゼを利用することによって、タンパク質分解的なプロセッシングを受けて活性化されたネズミグランザイム B の分泌を操作することに成功した ( P h a m 他 ( 1 9 9 8 )、J . B i o l . C h e m . 2 7 3 : 1 6 2 9 ~ 1 6 3 3 )。本発明の別の局面により、プロテアーゼの活性化を容易にするプロテアーゼ T をコードする、プロテアーゼ T を含む融合遺伝子が提供される。

#### 【0059】

タンパク質をコードする DNA クローン ( プロテアーゼ T の DNA を含む ) が同定される。これは、組換え宿主において発現したときに、プロテアーゼ T のアミノ酸配列を有し、そしてタンパク質分解活性を有してもよく、またはタンパク質分解活性を有していなくてもよいタンパク質を産生する。プロテアーゼ T の DNA の発現は、プロテアーゼ T をコードするポリ ( A ) <sup>+</sup> RNA が注入された卵母細胞において認められる性質の再構成をもたらす。

#### 【0060】

組換えプロテアーゼ T は、プロテアーゼ T の未成熟な全長のプロテアーゼ T ポリペプチドフラグメントに対して特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて作製される免疫アフィニティーカラムを使用することによって他の細胞タンパク質から分離することができる。プロテアーゼ T に対するモノ特異性抗体は、プロテアーゼ T に対して反応し得る抗体を含有する哺乳動物抗血清から精製されるか、または K o h l e r および M i l s t e i n ( 1 9 7 6 ) ( E u r . J . I m m u n o l . 6 : 5 1 1 ~ 9 ) の技術を使用して、プロテアーゼ T と反応し得るモノクローナル抗体として調製される。本明細書中で使用されている単一特異性抗体は、プロテアーゼ T に対して均一的な結合特性を有する単一種抗体または多種抗体種として定義される。本明細書中で使用されている均一結合は、上記に記載されているように、プロテアーゼ T と会合する抗体種などの、特異的な抗原またはエピトープに抗体種は結合し得ることをいう。プロテアーゼ T に特異的な抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ウマなどの動物 ( ウサギが好ましい ) を、免疫アジュバントの存在下または非存在下のいずれかで適正な濃度のプロテアーゼ T で免疫化することによって生じる。

## 【0061】

免疫前血清が最初の免疫化前に採取される。それぞれの動物には、推定されたプロテアーゼTのDNA配列に由来するか、あるいはおそらくはプロテアーゼTタンパク質自身の化学的分解または酵素的消化によって得られるプロテアーゼTタンパク質またはペプチドの約0.1mg～約1000mgが、受容可能な免疫アジュバントと組み合わせて投与される。そのような受容可能な免疫アジュバントには、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、ミョウバン沈殿物、*Corynebacterium parvum*およびtRNAを含有する油中水型エマルション、またはTitermax (CytRx、Norcross、GA)が含まれるが、これらに限定されない。最初の免疫化は、皮下(SC)または腹腔内(IP)のいずれか、あるいはその両方での多数部位における、好ましくはフロイント完全アジュバントにおけるプロテアーゼT抗原からなる。それぞれの動物は一定の間隔(好ましくは、毎週)で採血され、抗体力価が測定される。動物には、最初の免疫化の後、追加免疫注射を行ってもよく、または行わなくてよい。追加免疫注射を受けるそのような動物には、一般に、フロイント不完全アジュバントにおける等量の抗原が同じ経路によって与えられる。追加免疫注射は、最大の力価が得られるまで約3週間の間隔で与えられる。それぞれの追加免疫化を行った約7日後に、または単回の免疫化を行った後のほぼ毎週、動物は採血され、血清が採取され、一部が約-20℃で保存される。

## 【0062】

プロテアーゼTと反応し得るモノクローナル抗体(MoAb)は、推定されたプロテアーゼTのDNA配列に由来するか、あるいはおそらくはプロテアーゼTタンパク質自身の化学的分解または酵素的消化によって得られるプロテアーゼTタンパク質またはペプチドで、同系交配のマウス(好ましくは、Balb/c)を免疫化することによって調製される。マウスは、上記に議論されたように、約0.1mg～約10mg(好ましくは約1mg)のプロテアーゼT抗原を含む0.5mlの緩衝液または生理食塩水が等容量の受容可能なアジュバントに配合されてIP経路またはSC経路によって免疫化される。フロイント完全アジュバントが好ましい。マウスは、最初の免疫化を0日目に受け、約3週間～約30週間

安静にされる。免疫化されたマウスには、リン酸塩緩衝化生理食塩水などの緩衝剤溶液における約0.1mg~約10mgのプロテアーゼT抗原の1回または2回以上の追加免疫化が静脈内(IV)経路によって施される。抗体陽性マウスに由来するリンパ球(好ましくは、脾臓リンパ球)が、免疫化されたマウスからこの分野で知られている標準的な手法によって脾臓を取り出すことによって得られる。ハイブリドーマ細胞が、安定なハイブリドーマ細胞の形成を可能にする条件のもとで脾臓リンパ球を適切な融合パートナー(好ましくは、ミエローマ細胞)と混合することによって作製される。融合パートナーには、マウスミエローマのP3/NS1/Ag4-1; MPC-11; S-194およびSp2/0(これらに限定されない)が含まれ得るが、Sp2/0が一般に好ましい。抗体産生細胞およびミエローマ細胞は、約30%~約50%の濃度のポリエチレングリコール(約1000の分子量)中において融合される。融合したハイブリドーマ細胞は、この分野で知られている手順により、ヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンが補充されたダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)において増殖させることによって選抜される。上清液が、約14日目、約18日目および約21日目に増殖陽性ウエルから採取され、そしてプロテアーゼTまたは抗原性ペプチドを抗原として使用する固相免疫放射アッセイ(SPIRA)などの免疫アッセイによって抗体産生についてスクリーニングされる。培養液もまた、MoAbのイソタイプを決定するためにオクタロニー沈殿アッセイで試験される。抗体陽性ウエルに由来するハイブリドーマ細胞は、MacPherson(軟寒天技術、Tissue Culture Methods and Applications、編者: KruseおよびPaterson、Academic Press、1973年)の軟寒天技術などの技術によってクローン化される。

#### 【0063】

モノクローナル抗体は、プリスタンで最初に刺激されたBalb/cマウスにマウスあたり約0.5mlで約 $2 \times 10^6$ 個~約 $6 \times 10^6$ 個のハイブリドーマ細胞を刺激後の約4日目に注射することによってインビボで作製される。腹水が細胞移入の約8日後~12日後に採取され、そしてモノクローナル抗体が、この分野で知られている技術によって精製される。

## 【0064】

抗プロテアーゼT MoAbのインビトロ作製が、十分な量の特異的なMoAbを得るために、2%胎児ウシ血清を含有するDMEMにおいてハイブリドーマを増殖させることによって行われる。モノクローナル抗体は、この分野で知られている技術によって精製される。

## 【0065】

腹水またはハイブリドーマ培養液の抗体力価は、沈殿、受動凝集、酵素結合免疫吸着抗体(ELISA)技術および放射免疫アッセイ(RIA)技術(これらに限定されない)を含む様々な血清学的アッセイまたは免疫学的アッセイによって測定される。類似したアッセイが、体液または組織抽出物または細胞抽出物におけるプロテアーゼTの存在を検出するために使用される。

## 【0066】

単一特異性抗体を作製するための上記の方法は、プロテアーゼTポリペプチドフラグメントまたは未成熟な全長型プロテアーゼTポリペプチドに対して特異的な抗体を作製するために使用され得ることが当業者には容易に明かである。詳細には、1つだけまたは2つ以上のプロテアーゼTエピトープに対して特異的である単一特異性抗体が作製され得ることは当業者には容易に明かである。

## 【0067】

プロテアーゼT抗体のアフィニティーカラムが、抗体がアガロースゲルビーズ担体との共有結合を形成するようにN-ヒドロキシスクシンイミドエステルで活性化されたゲル担体のAffigel-10(Bio-Rad)に抗体を付加することによって作製される。その後、抗体が、スペーサーアームを伴うアミド結合を介してゲルにカップリングされる。その後、残った活性化エステルは、1MエタノールアミンHCl(pH8)で処理される。カラムは水で洗浄され、その後、0.23MグリシンHCl(pH2.6)で洗浄されて、結合していない抗体または外来タンパク質が除かれる。その後、カラムはリン酸塩緩衝化生理食塩水(pH7.3)で平衡化され、そしてプロテアーゼTを含有する細胞培養上清または細胞抽出物がカラムにゆっくり通される。その後、カラムは、光学密度( $A_{280}$ )がバックグラウンドに低下するまでリン酸塩緩衝化生理食塩水で洗浄

され、その後、タンパク質が0.23 MグリシンHCl (pH 2.6)で溶出される。その後、精製されたプロテアーゼTタンパク質はリン酸塩緩衝化生理食塩水に対して透析される。

#### 【0068】

プロテアーゼTのmRNAは、胃、精巣、網膜および繊維芽細胞において発現している。これらにおいて、コードされたプロテアーゼTタンパク質は、正常な生理学機能において、そしておそらくは病理学的状態において重要な機能を果たし得る。さらに、プロテアーゼTのmRNAは、脊髄などの多くの神経学的組織、および脳のいくつかの領域において検出される。プロテアーゼTのmRNAは、白血球およびジャーカット(ATCC TIB-152)T細胞株においてもまた見出され、従ってT細胞において発現し得る。従って、プロテアーゼT機能の調節剤は、これらの組織傷害を処置するために使用することができる。従って、プロテアーゼT機能の調節剤は、胃障害、精巣障害、網膜障害、皮膚科学的障害、神経学的/神経変性的障害または免疫学的障害を処置するために潜在的に使用することができる。

#### 【0069】

本発明はまた、プロテアーゼTタンパク質の機能だけでなく、プロテアーゼTをコードするDNAまたはRNAの発現をインビボで調節する化合物をスクリーニングするための方法に関する。これらの活性を調節する化合物は、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質または非タンパク質性有機分子であり得る。化合物は、プロテアーゼTをコードするDNAまたはRNAの発現、あるいはプロテアーゼTタンパク質の機能を高めるか、または弱めることによって調節することができる。プロテアーゼTをコードするDNAまたはRNAの発現あるいはプロテアーゼTタンパク質の機能を調節する化合物は、様々なアッセイによって検出することができる。アッセイは、発現または機能における変化が存在するかどうかを測定する単なる「yes/no」アッセイであり得る。アッセイは、試験サンプルの発現または機能を標準サンプルにおける発現または機能のレベルと比較することによって定量的にすることができる。このような方法で同定された調節剤は治療剤として潜在的に有用である。プロテアーゼTのタンパク質分解活性を調節

する化合物の検出方法は、化合物、プロテアーゼTおよび好適な標識された基質を一緒にすること、そしてプロテアーゼに対する化合物の作用を時間の関数として基質量の変化によってモニターすることを含む。標識された基質には、放射能標識された基質 (Coolican他(1986)、J. Biol. Chem. 261:4170~6)、蛍光測定用基質 (Loneragan他(1995)、J. Food. Sci. 60:72~3、78; Twining(1984)、Anal. Biochem. 143:30~4) または比色測定用基質 (Buroker-KilgoreおよびWang(1993)、Anal. Biochem. 208:387~92) が含まれるが、これらに限定されない。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後のザイモグラフィー (WadstroemおよびSmyth(1973)、Sci. Tools、20:17~21)、ならびに蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく方法によるザイモグラフィー (NgおよびAuld(1989)、Anal. Biochem. 183:50~6) もまた、プロテアーゼTのタンパク質分解活性を調節する化合物を検出するために使用される方法である。アゴニストである化合物は、基質の分解速度を増大させ、時間の関数として残存基質を減少させる。アンタゴニストである化合物は、基質の分解速度を低下させ、時間の関数として残存基質を増大させる。

#### 【0070】

プロテアーゼTのDNAまたはRNA、プロテアーゼTに対する抗体、あるいはプロテアーゼTタンパク質を含むキットを調製することができる。そのようなキットは、プロテアーゼTのDNAにハイブリダイゼーションするDNAを検出するために、あるいはサンプル中のプロテアーゼTタンパク質またはペプチドフラグメントの存在を検出するために使用される。そのような特徴付けは、法廷分析、診断適用および疫学的研究 (これらに限定されない) を含む様々な目的に有用である。

#### 【0071】

本発明のDNA分子、RNA分子、組換えタンパク質および抗体は、プロテアーゼTのDNA、プロテアーゼTのRNAまたはプロテアーゼTタンパク質をスクリーニングして、そのレベルを測定するために使用することができる。本発明

の組換えタンパク質、DNA分子、RNA分子および抗体は、プロテアーゼTの検出およびタイプ決定に好適なキットを組み立てるために役に立つ。そのようなキットは、密閉された状態で少なくとも1つの容器を保つために好適な区画化されたキャリアを含む。キャリアは、プロテアーゼTタンパク質を検出するために好適な組換えプロテアーゼTタンパク質または抗プロテアーゼT抗体などの試薬をさらに含む。キャリアはまた、標識された抗原または酵素基質などの検出手段を含むことができる。

#### 【0072】

プロテアーゼTをコードするDNA配列に対して相補的であるヌクレオチド配列をアンチセンス治療のために合成することができる。このようなアンチセンス分子は、DNA、ホスホロチオアートまたはメチルホスホナートなどのDNAの安定な誘導体、RNA、2'-O-アルキルRNAなどのRNAの安定な誘導体、あるいは他のプロテアーゼTアンチセンスオリゴヌクレオチド模倣体であり得る。プロテアーゼTアンチセンス分子は、顕微注入またはリポソームカプセル化によって、あるいはアンチセンス配列を有するベクターから発現させることによって細胞内に導入することができる。プロテアーゼTアンチセンス治療は、プロテアーゼTの発現または活性を低下させることが有益である疾患を処置するために特に有用であり得る。

#### 【0073】

プロテアーゼTの遺伝子治療は、プロテアーゼTを標的生物の細胞に導入するために使用することができる。プロテアーゼTの遺伝子は、受容宿主細胞に感染することによってプロテアーゼTのDNAの移入を媒介するウイルスベクターに連結することができる。好適なウイルスベクターには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルスなどが含まれる。あるいは、プロテアーゼTのDNAは、リガンド-DNA結合体またはアデノウイルス-リガンド-DNA結合体を使用する受容体媒介による標的化DNA移入、リポフェクション膜融合あるいは直接的な顕微注入を含む非ウイルス技術によって遺伝子治療のために細胞に移すことができる。これらの手法およびその変法は、インビボだけでなくエクシボでのプロテアー

ゼT遺伝子治療に好適である。プロテアーゼT遺伝子治療は、プロテアーゼTの発現または活性を高めることが有益である疾患を処置するために特に有用であり得る。

#### 【0074】

本発明はまた、本発明の新規な処置方法において使用される好適な局所用薬学的組成物、経口用薬学的組成物、全身用薬学的組成物および非経口用薬学的組成物を提供するという目的を有する。本発明により同定される化合物または調節剤を、プロテアーゼT活性の調節において使用される有効成分として含有する組成物は、従来の投与用ビヒクルにおける非常に様々な治療投薬形態で投与することができる。例えば、本発明の化合物または調節剤は、錠剤、カプセル剤（それぞれが徐放性配合物または持続的放出配合物を含む）、ピル剤、粉末剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤およびエマルション剤のような経口投薬形態で、あるいは注射によって投与することができる。同様に、本発明の化合物または調節剤はまた、静脈内形態（ボラスおよび注入の両方）、腹腔内形態、皮下形態、閉鎖性または非閉鎖性の局所形態で投与することができる。これらはすべて、製薬分野の当業者に十分に知られている形態を使用する。効果的であるが、非毒性的な量の所望する化合物を、プロテアーゼTの調節用薬剤として用いることができる。

#### 【0075】

製剤の1日の用量は、0.01~1,000mg/患者/日の広い範囲にわたって変化させることができる。経口投与の場合、組成物は、0.01mg、0.05mg、0.1mg、0.5mg、1.0mg、2.5mg、5.0mg、10.0mg、15.0mg、25.0mgおよび50.0mgの有効成分を含み、投薬量を症状に応じて調節するための刻み目を有する錠剤または刻み目のない錠剤の形態で処置患者に与えられることが好ましい。薬物の効果的な量は、通常的には、1日あたり約0.0001mg/kg体重~約100mg/kg体重の投薬量レベルで与えられる。範囲は、より詳しくは、1日あたり約0.001mg/kg体重~約10mg/kg体重である。プロテアーゼT調節剤の投薬量は、所望する効果を達成するために組み合わせられた場合には調節される。一方で

、これらの様々な薬剤の投薬量は、独立して最適化することができ、そしていずれかの薬剤が単独で使用された場合よりも大きく病状が低下する相乗的な効果を達成するために組み合わせることができる。

#### 【0076】

都合よいことに、本発明の化合物または調節剤は単回の日用量で投与することができ、あるいは1日の総投薬量を、1日あたり2回、3回または4回の分割された用量で投与することができる。さらに、本発明の化合物または調節剤は、好適な鼻腔内ビヒクルを局所的に使用することによって、または当業者に十分に知られている経皮皮膚パッチのそのような形態を使用して経皮的経路によって鼻腔内形態で投与することができる。経皮送達システムの形態で投与するためには、投薬は、当然のことではあるが、投薬期間中を通して間断的ではなく、むしろ連続的に行われる。

#### 【0077】

活性な薬剤が別の投薬配合物になっている2つ以上の活性な薬剤を用いる混合処置の場合、活性な薬剤は同時に投与することができ、または別々に時間をずらしてそれぞれ投与することができる。

#### 【0078】

本発明の化合物または調節剤を利用する投薬法は、患者のタイプ、種、年齢、体重、性別および医学的状态；処置される状態の重篤度；投与経路；患者の腎機能および肝機能；ならびに用いられるその特定の化合物を含む様々な要因に従って選択される。通常の技量を有する医師または獣医は、状態の進行を妨げ、阻止し、または停止させるために必要とされる薬物の効果的な量を容易に決定して処方することができる。毒性を伴うことなく効力をもたらす範囲に薬物濃度を達成する際における最適な精密さは、標的部位に対する薬物利用性の速度論に基づく療法を必要とする。これは、薬物の分布、平衡および除去の検討を伴う。

#### 【0079】

本発明の方法において、本明細書中に詳しく記載されている化合物または調節剤は、有効成分として役立つし、そして典型的には、目的とする投与形態（すなわち、経口用の錠剤、カプセル化剤、エリキシル剤、シロップ剤など）に関

して好適に選択され、そして従来の製薬規準と一致する好適な薬学的な希釈剤、賦形剤またはキャリア（これらは「キャリア」物質と本明細書中では総称的に示される）と混合されて投与される。

#### 【0080】

例えば、錠剤またはカプセル剤で経口投与される場合、活性な薬物成分は、経口用で、非毒性の薬学的に受容可能な不活性キャリア（エタノール、グリセロール、水など）と一緒にすることができる。さらに、所望する場合または必要な場合には、好適な結合剤、滑沢剤、崩壊剤および着色剤もまた混合物に配合することができる。好適な結合剤には、デンプン、ゼラチン、天然の糖類（グルコースまたは - ラクトースなど）、コーン甘味剤、天然ゴムおよび合成ゴム（アラビアゴム、トラガカントゴムまたはアルギン酸ナトリウムなど）、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ワックスなどが含まれるが、これらには限定されない。これらの投薬形態物において使用される滑沢剤には、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが含まれるが、これらには限定されない。崩壊剤には、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサントガムなどが含まれるが、これらには限定されない。

#### 【0081】

液体形態の場合、活性な薬物成分は、合成ゴムおよび天然ゴムなどの好適に味付けられた懸濁剤または分散剤、例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、メチルセルロースなどに混合することができる。用いられ得る他の分散剤には、グリセリンなどが含まれる。非経口投与される場合、滅菌の懸濁物および溶液が所望される。等張性の調製物は、一般には好適な保存剤を含有するが、静脈内投与が所望されるときには用いられる。

#### 【0082】

活性な薬物成分を含有する局所用調製物は、例えば、アルコール性溶液、局所用クレンザー、洗浄用クリーム、スキングル、スキンローション、およびクリームまたはゲルの配合物であるシャンプーを作製するために、この分野で十分に知られている様々なキャリア物質（アルコール、アロエ・ベラゲル、アラントイン

、グリセリン、ビタミンAおよびEオイル、鉱油、PPG2ミリスチルプロピオナートなど)と混合することができる。

【0083】

本発明の化合物または調節剤はまた、小さな単層小胞、大きな単層小胞および多層小胞などのリポソーム送達システムの形態で投与することができる。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミンまたはホスファチジルコリンなどの様々なリン脂質から作製することができる。

【0084】

本発明の化合物はまた、化合物分子がカップリングされる個々のキャリアとしてモノクローナル抗体を使用することによって送達することができる。本発明の化合物または調節剤はまた、標的化可能な薬物キャリアとして可溶性ポリマーとカップリングすることができる。そのようなポリマーには、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピルメチルアミドフェノール、ポリヒドロキシエチルアスパルトアミドフェノール、またはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリシンが含まれ得る。さらに、本発明の化合物または調節剤は、薬物の制御された放出を達成することにおいて有用な一群の生分解性ポリマー(例えば、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリラート、およびヒドロゲルの架橋型または両親媒性のブロックコポリマー)にカップリングすることができる。

【0085】

経口投与される場合、本発明の化合物または調節剤は、カプセル剤、錠剤またはポーラス形態で投与することができ、あるいは動物飼料に混合することができる。カプセル剤、錠剤およびポーラス剤は、デンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウムまたはリン酸二カルシウムなどの適切なキャリアビヒクルと組み合わせられた有効成分から構成される。これらのユニット投薬形態物は、均一な混合物が得られるように、有効成分を、微粉化された好適な不活性成分(希釈剤、充填剤、崩壊剤および/または結合剤を含む)と十分に混合することによって調製される。不活性成分は、本発明の化合物または調節剤と反応せず、そして処置さ

れている動物に対して非毒性である成分である。好適な不活性成分には、デンプン、ラクトース、タルク、ステアリン酸マグネシウム、植物性ゴムおよび植物油などが含まれる。これらの配合物は、処置される動物種のサイズおよびタイプならびに感染のタイプおよび重篤度などの数多くの要因に依存して、広範囲に変化し得る量の有効成分および不活性成分を含有することができる。有効成分はまた、化合物を食物と単に混合することによって、または化合物を飼料の表面に加えることによって、飼料に対する添加物として投与することができる。あるいは、有効成分は不活性なキャリアと混合することができ、そして得られた組成物は飼料と混合することができるか、または動物に直接与えることができる。好適な不活性キャリアには、トウモロコシ粉、柑橘果実粉、発酵残渣、ダイズグリット、乾燥穀粒などが含まれる。有効成分は、最終的な組成物に0.001重量%~5重量%の有効成分が含有されるように、摩砕、攪拌、粉碎または回転混合によってこれらの不活性キャリアと十分に混合される。

#### 【0086】

あるいは、本発明の化合物または調節剤は、不活性な液体キャリアに溶解された有効成分からなる配合物を注射することによって非経口的に投与することができる。注射は、筋肉内、胃内、気管内または皮下のいずれかであり得る。注射用配合物は、適切な不活性液体キャリアと混合された有効成分からなる。受容可能な液体キャリアには、ピーナッツオイル、綿実油、ゴマ油などの植物油、ならびにソルケタル(solketal)、グリセロールホルマルなどの有機溶媒が含まれる。代替のものとして、水性の非経口用配合物もまた使用することができる。植物油は好ましい液体キャリアである。配合物は、最終的な配合物に0.005重量%~10重量%の有効成分が含有されるように、有効成分を液体キャリアに溶解または懸濁することによって調製される。

#### 【0087】

本発明の化合物または調節剤の局所的適用は、本発明の化合物または調節剤を含有する液体の水剤またはシャンプーを水性の溶液または懸濁物として使用することによって可能である。これらの配合物は、一般には、ベントナイトなどの懸濁剤を含有し、そして通常的には泡立ち防止剤をも含有する。0.005重量%

～10重量%の有効成分を含有する配合物が受容可能である。好ましい配合物は、0.01重量%～5重量%の本発明の化合物または調節剤を含有する配合物である。

#### 【0088】

プロテアーゼは、洗濯用洗剤、食品加工、繊維加工およびスキンケア用製品を含む様々な商業目的のために非天然の環境で使用されている。洗濯用洗剤において、プロテアーゼは、溶解性が良くない有機化合物を、より容易に洗剤および水に溶解し得るより溶解しやすい形態に分解するために用いられている。この能力において、プロテアーゼは「汚れ除去剤」として作用している。食品加工の例には、食肉を柔らかくすることおよびチーズ製造が含まれる。プロテアーゼは、例えば、繊維の収縮を防止するために、ウールを処理する繊維加工において使用されている。プロテアーゼは、落屑速度の平衡異常のために積み重なる皮膚表面の鱗屑を除くためにスキンケア用製品に含められることがある。これらの適用のいくつかにおいて汎用されるプロテアーゼは、それらの酵素を工業的に製造するために容易に増殖させられる原核生物細胞または真核生物細胞に由来する。例えば、使用される一般的な種は、米国特許第5,217,878号に記載されているようなバチルス属である。あるいは、米国特許第5,278,062号には、洗濯用洗剤組成物において使用される、真菌トリチラクウム・アルブムから単離されたセリンプロテアーゼが記載されている。残念なことに、いくつかのプロテアーゼは、過敏症のヒトにおいてアレルギー反応をプロテアーゼが引き起こし得ることによって、または非天然の環境で使用されたときにおける低下した効力によって、その使用が制限されている。非ヒト起源に由来するプロテアーゼタンパク質は過敏症のヒトにおいて免疫応答をより誘導しやすいことが予想される。これらの制限のために、過敏症のヒトに対する免疫原性がほとんどなく、かつ/また非天然の環境では効率的なタンパク質分解活性を提供する代わりにプロテアーゼが求められている。組換え技術の出現により、工業的製造に好適な宿主において任意の種のタンパク質を発現させることが可能になっている。

#### 【0089】

本発明の別の局面は、プロテアーゼTおよび受容可能なキャリアを含む組成物

に関する。本発明の組成物は、プロテアーゼ成分を必要とする任意の様々な組成物であり得る。特に好ましいものは、例えば、使用または製造により、ヒトと接触し得る組成物である。本発明のプロテアーゼTの使用は、既知のプロテアーゼ（特に、非ヒト起源のプロテアーゼ）を含有する類似した組成物で使用者および/または取扱者がそうでない場合に経験する免疫原性応答を低下させるか、またはそのような応答を除去すると考えられる。好ましい組成物は、スキンケア用組成物および洗濯用洗剤組成物である。

#### 【0090】

本明細書中において、「受容可能なキャリア」には、化粧品的に受容可能なキャリア、薬学的に受容可能なキャリア、および洗浄用組成物における使用に受け入れられ得るキャリアが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0091】

##### スキンケア用組成物

本発明のスキンケア用組成物は、好ましくは、プロテアーゼTに加えて、化粧品的に受容可能なキャリアまたは薬学的に受容可能なキャリアを含む。

#### 【0092】

本明細書中において、「化粧品的に受容可能なキャリア」は、過度な毒性、不適合性、不安定性、刺激、アレルギー応答などを伴うことなくヒトおよび下等動物の皮膚との接触状態での使用に好適であり、そして妥当な受益性/危険性割合に対応する1つまたは2つ以上の適合し得る固体または液体の充填剤、希釈剤またはカプセル化物質を意味する。

#### 【0093】

本明細書中において、「薬学的に受容可能な」は、過度な毒性、不適合性、不安定性、刺激、アレルギー応答などを伴うことなくヒトおよび下等動物の組織との接触状態での使用に好適であり、そして妥当な受益性/危険性割合に対応する1つまたは2つ以上の適合し得る薬物、医薬品または不活性な成分を意味する。薬学的に受容可能なキャリアは、当然のことではあるが、処置されている哺乳動物への投与に関してそれらが好適であるために十分に高純度であり、かつ十分に低い毒性でなければならない。

## 【0094】

本明細書中において、「適合し得る」は、化粧品組成物または薬学的組成物の成分が、通常的使用状況のもとで組成物の化粧品効力または薬学的効力を実質的に低下させる相互作用が存在しないような様式で、プロテアーゼTと、そして相互に混合され得ることを意味する。

## 【0095】

好ましくは、本発明のスキンケア用組成物は局所用組成物である。すなわち、本発明のスキンケア用組成物は、組成物を皮膚に直接塗るか、または広げることによって局所的に適用される。好ましくは、そのような組成物は、化粧品的または薬学的に受容可能な局所用キャリアを含む。

## 【0096】

本発明の局所用組成物は非常に様々な製品タイプにすることができる。これらには、ローション、クリーム、ビーチオイル、ゲル、スティック、スプレー、軟膏、ペースト、ムースおよび化粧品；シャンプーおよびコンディショナーなどの毛髪ケア用組成物（例えば、ふけを処置/防止するためのもの）；ならびに個人用の洗浄用組成物が含まれるが、これらに限定されない。これらの製品タイプは、溶液、エマルジョン、ゲルおよび固体（これらに限定されない）を含むいくつかのキャリアシステムを含むことができる。

## 【0097】

好ましくは、キャリアは、化粧品的または薬学的に受容可能な水性溶媒または有機溶媒である。水が好ましい溶媒である。好適な有機溶媒の例には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール（200～600）、ポリプロピレングリコール（425～2025）、プロピレングリコール-14ブチルエーテル、グリセロール、1,2,4-ブタントリオール、ソルビトールエステル、1,2,6-ヘキサントリオール、エタノール、イソプロパノール、ブタンジオールおよびそれらの混合物が含まれる。本発明において有用なそのような溶液は、好ましくは、約0.001%～約25%のプロテアーゼT（より好ましくは約0.1%～約10%、より好ましくは約0.5%～約5%）と、好ましくは約50%～約99.99%の受容可能な水性溶媒または有機溶媒（より好ましくは約90%

～約99%)を含有する。

#### 【0098】

本発明のスキンケア用組成物は、局所用組成物において従来的に使用されている非常に様々なさらなる油溶性物質および/または水溶性物質を、それらのこの分野で確立されたレベルでさらに含むことができる。そのようなさらなる成分には、増粘剤、顔料、香料、湿潤剤、タンパク質およびポリペプチド、保存剤、鎮静剤、浸透増強剤、コラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチン、加水分解物、サクラソウ油、ホホバ油、上皮増殖因子、ダイズサポニン、ムコ多糖、ビタミンAおよびその誘導体、ビタミンB2、ビオチン、パントテン酸、ビタミンDならびにそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0099】

##### 洗浄用組成物

本発明の洗浄用組成物は、好ましくは、プロテアーゼTに加えて、界面活性剤を含む。本発明の洗浄用組成物は、ハード型表面洗浄用組成物、食器洗浄用組成物および洗濯洗剤用組成物(これらに限定されない)を含む非常に様々な形態であり得る。

#### 【0100】

好ましい洗浄用組成物は洗濯洗剤用組成物である。そのような洗濯洗剤用組成物には、顆粒状組成物、液状組成物および棒状組成物が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、洗浄用組成物はビルダーをさらに含む。

#### 【0101】

本発明の洗浄用組成物は、「洗浄有効量」をもたらすのに十分なレベルでプロテアーゼTを含有する。用語「洗浄有効量」は、繊維製品、食器およびその他のなどの基材に対する洗浄作用、汚れ除去作用、土壌除去作用、漂白作用、脱色作用または鮮やかさを改善する作用をもたらす任意の量を示す。現在の市販調製物に対する実用的な面で、典型的な量は、1グラムの洗剤組成物あたりの重量比で約5mgまでの活性酵素であり、典型的には0.01mg～3mgの活性酵素である。すなわち、洗濯用洗剤組成物は、本明細書中では、典型的には、0.001重量%～5重量%(好ましくは0.01重量%～3重量%、より好ましくは

0.01重量%～1重量%)の原料プロテアーゼT調製物を含む。本明細書において、「原料プロテアーゼT調製物」は、プロテアーゼTが洗濯用洗剤組成物へのその添加前において含有されている調製物または組成物を示す。好ましくは、プロテアーゼTは、1gの原料プロテアーゼT調製物について0.005～0.1アンソンユニット(AU)の活性が得られるのに十分なレベルでそのような原料プロテアーゼT調製物に存在する。自動食器洗浄などにおけるいくつかの洗剤の場合、非触媒作用的な活性物の総量を最小限にし、それにより染み形成/膜形成または他の最終結果を改善するために、原料プロテアーゼT調製物の活性プロテアーゼT含有量を大きくすることは望ましいと考えられる。活性レベルを大きくすることはまた、高濃度の洗剤配合物では望ましいことであり得る。

#### 【0102】

好ましくは、液状組成物(これに限定されない)を含む本発明の洗濯用洗剤組成物は、約0.001重量%～約10重量%(好ましくは約0.005重量%～約8重量%、最も好ましくは約0.01重量%～約6重量%)の酵素安定化システムを含むことができる。酵素安定化システムは、プロテアーゼT、または組成物に含ませることができる任意の他のさらなる洗浄性酵素と適合し得る任意の安定化システムであり得る。そのようなシステムは、他の配合活性体によって固有的に提供され得るか、あるいは例えば、配合者または洗剤用酵素の製造者によって別々に添加され得る。そのような安定化システムは、例えば、カルシウムイオン、ホウ酸、プロピレングリコール、短鎖カルボン酸、ホウ素(boronic)酸およびそれらの混合物を含むことができ、そして洗剤組成物のタイプおよび物理的形態に依存して種々の安定化問題を解決するために設計される。

#### 【0103】

本発明の洗剤組成物はまた洗浄性界面活性剤を含む。好ましくは、洗剤組成物は、少なくとも約0.01%の洗浄性界面活性剤を含み、より好ましくは少なくとも約0.1%の洗浄性界面活性剤を含み、より好ましくは少なくとも約1%の洗浄性界面活性剤を含み、さらにより好ましくは約1%～約55%の洗浄性界面活性剤を含む。

#### 【0104】

好ましい洗浄性界面活性剤は、カチオン性、アニオン性、非イオン性、両性、双性イオン性およびそれらの混合物であり、本明細書中下記においてさらに記載される。洗剤組成物において有用な洗浄性界面活性剤の非限定的な例には、従来のC11～C18アルキルベンゼンスルホン酸塩(「LAS」)、第一級、分枝鎖状およびランダムなC10～C20アルキル硫酸塩(「AS」)、式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x(\text{CHOSO}_3 - \text{M}^+) \text{CH}_3$ および式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y(\text{CHOSO}_3 - \text{M}^+) \text{CH}_2\text{CH}_3$ (式中、 $x$ および $(y+1)$ は少なくとも約7(好ましくは、少なくとも約9)の整数であり、Mは水溶性カチオン(特に、ナトリウム)である)のC10～C18第二級(2, 3)アルキル硫酸塩、オレイル硫酸塩などの不飽和硫酸塩、C10～C18アルキルアルコキシ硫酸塩(「AES」、特に、EO1～7エトキシ硫酸塩)、C10～C18アルキルアルコキシカルボン酸塩(特に、EO1～5エトキシカルボン酸)、C10～C18グリセロールエーテル、C10～C18アルキルポリグリコシドおよびその対応する硫酸化ポリグリコシド、ならびにC12～C18 - スルホン化脂肪酸エステルが含まれる。所望する場合には、従来の非イオン性界面活性剤および両性界面活性剤、例えば、いわゆる狭域アルキルエトキシラートおよびC6～C12アルキルフェノールアルコキシラート(特に、エトキシラートおよび混合型エトキシ/プロポキシ)を含むC12～C18アルキルエトキシラート(「AE」)、C12～C18ベタインおよびスルホベタイン(「スルタイン」)、C10～C18アミンオキシドなどもまた、すべての組成物に含ませることができる。C10～C18N-アルキルポリヒドロキシ脂肪酸アミドもまた使用することができる。典型的な例には、C12～C18N-メチルグルカミドが含まれる。国際特許出願公開WO9,206,154を参照のこと。糖に由来する他の界面活性剤には、C10～C18N-(3-メトキシプロピル)グルカミドなどのN-アルコキシポリヒドロキシ脂肪酸アミドが含まれる。N-プロピル～N-ヘキシルC12～C18グルカミドを、泡立ち性が低いために使用することができる。C10～C20の従来の石けんもまた使用することができる。大きな泡立ち性が所望される場合には、分枝鎖のC10～C16石けんを使用することができる。アニオン性界面活性剤および非イオン性界面活性剤の混合物は特に有用である。他の従来の

有用な界面活性剤が標準的な教本に記載されている。

#### 【0105】

洗剤ビルダーもまた、ミネラル硬度を抑制することを助けるために洗濯用洗剤組成物に含まれる。無機ビルダーを、有機ビルダーと同様に使用することができる。ビルダーは、典型的には、粒子状の汚れを除去することを助けるために衣類洗濯用組成物において作用される。

#### 【0106】

ビルダーのレベルは、組成物の最終的な使用およびその所望される物理的形態に依存して広範囲に変化させることができる。存在する場合には、組成物は、典型的には、少なくとも約1%のビルダーを含む。液体の配合物は、典型的には、約5重量%～約50重量%(より典型的には約5重量%～約30重量%)の洗剤ビルダーを含む。顆粒状配合物は、典型的には、約10重量%～約80重量%(より典型的には約15重量%～約50重量%)の洗剤ビルダーを含む。しかし、ビルダーのそれらよりも少ないレベルまたはそれらよりも多いレベルが除外されることを意味していない。

#### 【0107】

無機洗剤ビルダーまたはP含有洗剤ビルダーには、ポリリン酸塩(トリポリリン酸塩、ピロリン酸塩およびガラス状ポリメタリン酸塩によって例示される)、ホスホン酸塩、フィチン酸、ケイ酸塩、炭酸塩(重炭酸塩およびセスキ炭酸塩を含む)、硫酸塩およびアルミケイ酸塩のアルカリ金属塩、アンモニウム塩およびアルカノールアンモニウム塩が含まれるが、これらに限定されない。しかし、非リンビルダーが一部の地域では要求される。重要なことに、本明細書中の組成物は、(リン酸塩と比較して)クエン酸塩などのいわゆる「弱い」ビルダーの存在下でさえも、あるいはゼオライトまたは層状ケイ酸塩ビルダーとともに存在し得るいわゆる「アンダービルト(underbuilt)」状況でさえも驚くほど十分に機能する。

#### 【0108】

ケイ酸塩ビルダーの例は、アルカリ金属ケイ酸塩であり、特に、 $\text{SiO}_2 : \text{Na}_2\text{O}$ 比が1.6 : 1～3.2 : 1の範囲にあるアルカリ金属ケイ酸塩および層

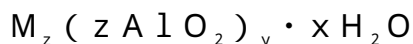
状ケイ酸塩（米国特許第4,664,839号（H.P.Rieckに対して1987年5月12日発行）に記載される層状ケイ酸ナトリウムなど）である。NaSKS-6は、ヘキスト社によって販売されている結晶性層状ケイ酸塩の商標である（これは本明細書中では「SKS-6」と一般に略記される）。ゼオライトビルダーとは異なり、NaSKS-6ケイ酸塩ビルダーはアルミニウムを含有していない。NaSKS-6は、層状ケイ酸塩の $-Na_2SiO_5$ の形態学的形態を有する。これは、ドイツ国特許DE-A-3,417,649および同DE-A-3,742,043に記載される方法などの方法によって調製することができる。SKS-6は、本明細書中における使用に非常に好ましい層状ケイ酸塩であるが、他のそのような層状ケイ酸塩、例えば、一般式 $NaMSi_xO_{2x} + 1yH_2O$ （式中、Mはナトリウムまたは水素であり、xは1.9~4の数（好ましくは2）であり、yは0~20の数（好ましくは0）である）を有する層状ケイ酸塩などを本明細書中において使用することができる。ヘキスト社から得られる様々な他の層状ケイ酸塩には、型、型および型としてのNaSKS-5、NaSKS-7およびNaSKS-11が含まれる。上記に記されているように、 $-Na_2SiO_5$ （SKS-6型）は本明細書中における使用に最も好ましい。例えば、ケイ酸マグネシウムなどの他のケイ酸塩もまた有用であり得る。ケイ酸マグネシウムは、顆粒状配合物における巻縮剤として、酸素漂白剤に対する安定化剤として、そして泡立ち抑制システムの成分として役に立ち得る。

#### 【0109】

炭酸塩ビルダーの例は、ドイツ国特許出願第2,321,001号（1973年11月15日公開）に開示されているようなアルカリ土類金属炭酸塩およびアルカリ金属炭酸塩である。

#### 【0110】

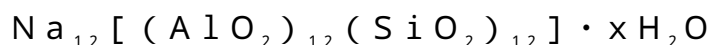
アルミノケイ酸塩ビルダーは本発明においては有用である。アルミノケイ酸塩ビルダーは、ごく最近に上市されたヘビーデューティ顆粒状洗剤組成物においては非常に重要であり、そしてまた液状の洗剤配合物における重要なビルダー成分であり得る。アルミノケイ酸塩ビルダーには、下記の実験式を有するものが含まれる：



式中、zおよびyは少なくとも6の整数であり、z対yのモル比は1.0～約0.5の範囲内にあり、xは約15～約264の整数である。

#### 【0111】

有用なアルミノケイ酸塩イオン交換物質が市販されている。このようなアルミノケイ酸塩は、構造が結晶性または非晶質であり得るし、天然に存在するアルミノケイ酸塩である得るか、または合成的に得ることができる。アルミノケイ酸塩イオン交換物質を製造するための方法が米国特許第3,985,669号(Krummel他、1976年10月12日発行)に開示されている。本明細書中において有用な好ましい合成された結晶性アルミノケイ酸塩イオン交換物質は、ゼオライトA、ゼオライトP(b)、ゼオライトMAPおよびゼオライトXの名称で得ることができる。特に好ましい実施形態において、結晶性のアルミノケイ酸塩イオン交換物質は下記の式を有する：



式中、xは約20～約30であり、特に約27である。この物質は、ゼオライトAとして知られている。脱水されたゼオライト(z=0～10)もまた本明細書中で使用することができる。好ましくは、アルミノケイ酸塩は、直径が約0.1ミクロン～10ミクロンである粒子サイズを有する。

#### 【0112】

本発明の目的のために好適な有機の洗剤ビルダーには、非常に様々なポリカルボン酸塩化合物(これに限定されない)が含まれる。本明細書中で使用されている「ポリカルボン酸塩」は、多数のカルボキシラート基(好ましくは、少なくとも3つのカルボキシラート基)を有する化合物を示す。ポリカルボン酸塩ビルダーは、一般には、酸の形態で組成物に加えることができるが、中和された塩の形態で加えることもできる。塩の形態で用いられる場合、ナトリウム、カリウムおよびリチウムなどのアルカリ金属、またはアルカノールアンモニウム塩が好ましい。

#### 【0113】

ポリカルボン酸塩ビルダーには、様々な種類の有用な物質が含まれる。1つの

重要な種類のポリカルボン酸塩ビルダーには、米国特許第3,128,287号 (Berg、1964年4月7日発行) および米国特許第3,635,830号 (Lamberti他、1972年1月18日発行) に開示されているようなオキシニコハク酸塩を含むエーテルポリカルボン酸塩が含まれる。米国特許第4,663,071号 (Bush他、1987年5月5日発行) の「TMSFTDS」ビルダーもまた参照のこと。好適なエーテルポリカルボン酸塩にはまた、米国特許第3,923,679号 (Rapko、1975年12月2日発行) ; 米国特許第3,835,163号 (Rapko、1974年9月10日発行) ; 米国特許第4,158,635号 (Crutchfield他、1979年6月19日発行) ; 米国特許第4,120,874号 (Crutchfield他、1978年10月17日発行) ; および米国特許第4,102,903号 (Crutchfield他、1978年7月25日発行) に記載されている化合物などの環状化合物 (特に、脂環化合物) が含まれる。

#### 【0114】

他の有用な洗浄性ビルダーには、エーテルヒドロキシポリカルボン酸塩、無水マレイン酸とエチレンメチルエーテルまたはビニルメチルエーテルとの共重合体、1,3,5-トリヒドロキシベンゼン-2,4,6-トリスルホン酸、およびカルボキシメチルオキシニコハク酸、ポリ酢酸 (エチレンジアミン四酢酸およびニトリロ三酢酸など) の様々なアルカリ金属塩、アンモニウム塩および置換アンモニウム塩、ならびにメリト酸、コハク酸、オキシニコハク酸、ポリマレイン酸、ベンゼン-1,3,5-トリカルボン酸、カルボキシメチルオキシニコハク酸などのポリカルボン酸塩およびそれらの可溶性塩が含まれ、クエン酸塩ビルダー、例えば、クエン酸およびその可溶性塩 (特に、ナトリウム塩) は、それらが再利用可能な資源から得ることができ、そして生分解性を有するために、強力液体洗剤配合物に対して特に重要なポリカルボン酸塩ビルダーである。クエン酸塩はまた、顆粒状組成物において、特にゼオライトおよび/または層状ケイ酸塩ビルダーと組み合わせて使用することができる。オキシニコハク酸塩もまた、そのような組成物および組合せ物において特に有用である。

#### 【0115】

本発明の洗剤組成物では、米国特許第4,566,984号(Bush、1986年1月28日発行)に開示される3,3-ジカルボキシ-4-オキサ-1,6-ヘキサン二酸塩およびその関連化合物もまた好適である。有用なコハク酸ビルダーには、C5~C20アルキルコハク酸およびC5~C20アルケニルコハク酸およびそれらの塩が含まれる。このタイプの特に好ましい化合物はドデセニルコハク酸である。コハク酸塩ビルダーの具体的な例には、ラウリルコハク酸塩、ミリスチルコハク酸塩、パルミチルコハク酸塩、2-ドデセニルコハク酸塩(好ましい)、2-ペンタデセニルコハク酸塩などが含まれる。ラウリルコハク酸塩はこの群の好ましいビルダーであり、欧州特許出願200,263(Barrat他、1986年11月5日公開)に記載されている。

#### 【0116】

他の好適なポリカルボン酸塩が、米国特許第4,144,226号(Crutchfield他、1979年3月13日発行)および米国特許第3,308,067号(Diehl、1967年3月7日発行)に開示されている。米国特許第3,723,322号(Diehl、1973年3月27日発行)もまた参照のこと。

#### 【0117】

脂肪酸(例えば、C12~C18モノカルボン酸)もまた、さらなるビルダー活性を得るために、単独で、あるいは前記ビルダー(特に、クエン酸塩および/またはコハク酸塩ビルダー)と組み合わせて組成物に配合することができる。脂肪酸のそのような使用は、配合者によって考慮に入れられるはずである泡立ちを一般に減少させる。

#### 【0118】

リン系ビルダーが、特に手洗い操作のために使用される棒状洗剤の配合において使用され得る状況では、よく知られているトリポリリン酸ナトリウム塩、ピロリン酸ナトリウムおよびオルトリン酸ナトリウムなどの様々なアルカリ金属リン酸塩を使用することができる。ホスホン酸塩ビルダー、例えば、エタン-1-ヒドロキシ-1,1-二ホスホン酸塩および他の知られているホスホン酸塩(例えば、米国特許第3,159,581号(Diehl、1964年12月1日発行

) ; 米国特許第3,213,030号(Diehl、1965年10月19日発行) ; 米国特許第3,400,148号(Quimby、1968年9月3日発行) ; 米国特許第3,422,021号(Roy、1969年1月14日発行) ; および米国特許第3,422,137号(Quimby、1969年1月4日発行)を参照のこと)もまた使用することができる。

#### 【0119】

本発明の洗濯用洗剤組成物において使用され得るさらなる成分には、アルコキシル化ポリカルボン酸塩(例えば、さらなる油脂汚れ除去性能をもたらす)、漂白剤、漂白活性剤、漂白触媒、光沢剤、キレート化剤、粘土土壌除去剤/再付着防止剤、色移り阻害剤、さらなる酵素(リパーゼ、アミラーゼ、ヒドロラーゼおよび他のプロテアーゼを含む)、衣類柔軟剤、ポリマー汚れ剥離剤、ポリマー分散剤および泡立ち抑制剤が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0120】

本明細書中の組成物は、洗浄性能を助けるか、または高めるために、洗浄される基材を処理するために、あるいは洗剤組成物の審美性を変えるために、1つまたは2つ以上の他の洗剤添加物または他の物質をさらに含むことができる(例えば、芳香剤、着色剤、色素など)。

#### 【0121】

本明細書中の洗剤組成物は、アルコキシル化ポリカルボン酸塩、漂白用化合物、光沢剤、キレート化剤、粘土土壌除去剤/再付着防止剤、色移り阻害剤、酵素、酵素安定化システム、衣類柔軟剤、ポリマー汚れ剥離剤、ポリマー分散剤および泡立ち抑制剤を含む他の知られている洗剤用洗浄成分をさらに含むことができる。洗剤組成物はまた、キャリア、ヒドロトロピー剤、処理補助剤、色素または顔料、液状配合物の場合には溶媒、棒状組成物の場合には固体充填剤を含むことができる。

#### 【0122】

皮膚の剥落を処置または防止する方法

本発明の別の局面は、皮膚の剥落を処置または防止する方法に関する。この方法は、プロテアーゼTを含む組成物の安全かつ効果的な量を局所的に適用するこ

とを含む。

#### 【0123】

本明細書中において、「安全かつ効果的な量」は、妥当な医学的判断の範囲内において、処置される状態の著しい好転をもたらすために十分に大きく、しかし（妥当な受益性／危険性割合で）重大な副作用を避けるために十分に低いプロテアーゼTの量を意味する。プロテアーゼTの安全かつ効果的な量は、処置されている特定の状態、処置されている被験者の年齢および身体的状態、状態の重篤度、処置の継続時間、同時治療の性質、ならびに同様の要因により変化する。

#### 【0124】

本発明の方法において使用される好適な組成物には、（例えば、皮膚の剥落によって生じるふけを処置／防止する）毛髪ケア用組成物を含む上記に記載されるスキンケア用組成物が含まれる。

#### 【0125】

下記の実施例は本発明を例示するが、本発明は実施例により限定されない。

#### 【0126】

##### 実施例1

##### プラスミド操作：

すべての分子生物学的方法は、以前に記載された方法（Maniatis他（1989）、1～1626）に従った。別途示されない限り、オリゴヌクレオチドをRansom Hill Biosciences（Ransom Hill, CA）から購入し、すべての制限エンドヌクレアーゼおよび他のDNA修飾酵素をNew England Biolabs（Beverly, MA）から購入した。プロテアーゼTの発現構築物を、下記に記載されているように、構成的なアクチンプロモーターを特徴とするショウジョウバエ誘導発現ベクターpRM64において作製した。使用したショウジョウバエ発現ベクターは市販の発現ベクター（Invitrogen, San Diego, CA）と類似している。すべての構築物操作を、Allied Biosystems 377蛍光配列決定装置（Perkin Elmer, Foster City, CA）を使用して色素ターミネーターサイクル配列決定によって確認した。

## 【0127】

## プロテアーゼT cDNAの獲得

ライブラリーを、部分食道切除術、近位胃切除術および局所的リンパ節生検の時に53歳の白人男性から摘出された食道組織から単離された2マイクログラムのポリARNAを使用して構築した。cDNA合成を、NotI-オリゴ(dT)プライマーを使用して開始した。その後、二本鎖cDNAを平滑末端化して、EcoRIアダプターに連結し、そしてNotI消化およびサイズ選択を行い、改変されたプラスミドクローニングベクターのNotI部位およびEcoRI部位にクローン化した。全長のプロテアーゼT cDNAに対応するクローンは、873ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム(停止コドンを含む、図1)を含有し、他のS1セリンプロテアーゼの対する相同性を有した。このクローンはまた、AATAAAモチーフ残基がポリA部分の22ヌクレオチド上流に存在するので完全な3'非翻訳領域を含有すると考えられる。プロテアーゼT cDNAを用いたGenbankデータベースの相同性検索により、これは新規なcDNAであるが、染色体16p13.3にマッピングされるヒトコスミドクローン(400D1、Genbankアクセション番号AC004036)との同一性を有することが示された。これにより、プロテアーゼT遺伝子の位置が示される。推定されるオープンリーディングフレームは、290アミノ酸のプレプロプロテアーゼTタンパク質をコードし(図1)、約32Kdの推定される分子量(M<sub>r</sub>)および他のセリンプロテアーゼに対する強い相同性を有する。触媒作用の三つ組残基であるH、DおよびSが、それぞれ、75位、124位および229位に存在する。チモーゲン活性化配列は、他のS1セリンプロテアーゼのチモーゲン活性化配列と類似しており、これにより、256アミノ酸の成熟タンパク質が予測される。23アミノ酸のシグナルペプチドが統計的方法(Von Heijne(1986)、Nucleic Acids Res. 14:4683~90)によって予測される。これにより、12アミノ酸のプレ配列ペプチドが示される。推定されるプロテアーゼTのアミノ酸配列とS1セリンプロテアーゼファミリーの他のメンバーとのアラインメントの系統樹が図2に示される。これは、MegAlign3.1.7プログラム(DNA STAR Inc., Madi

son、WI)を使用して決定された。

### 【0128】

#### 実施例2

##### プロテアーゼTのmRNAの組織分布

本発明者らは高感度なPCRプロファイリング技術を用いて、プロテアーゼTのmRNAの組織分布を同定した。この適用のために、ヒトcDNAライブラリーをClontech(Palo Alto, CA)から得た。プロファイリング分析用のPCRプライマーは下記の通りであった：

配列番号2：ProtTPCRTP-U 5' - GCCAGGCCTGAGGACATGAG - 3'

配列番号3：ProtTPCRTP-L 5' - TGCGCTGGATGCTGACTTGC - 3'

50 µgのPCR反応物には、それぞれの試験されるcDNAライブラリーに由来する1 µlの希釈されたファージ保存液(約 $10^8 \sim 10^{10}$  pfu/ml)が使用された。反応物は、最初に94 °Cで5分間変性され、そして94 °Cで20秒間；56 °Cで20秒間；その後の72 °Cで30秒間の35サイクルに供され、その後、72 °Cで10分間の伸長に供された。下記配列：

配列番号4：ProtTPCRTP-PP 5' - CCAGGATGCTGAA CCGAATGGTGGGCGGGCAGGACACGCA - 3'

のネステッドプライマーを、 $\gamma$ - $^{32}$ P-ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼ(Life Technologies, Gaithersburg, MD)を使用して放射能標識し、取り込まれなかった標識を、QIAquickヌクレオチド除去カラム(Qiagen, Valencia, CA)を使用して反応後に除いた。 $^{32}$ Pで末端標識されたネステッドプライマープローブ(1 X  $10^5$  cpm)をPCR反応後の各サンプルの10 µlと一緒にした。PCR産物-プローブ混合物を94 °Cで5分間変性して、60 °Cで15分間のハイブリダイゼーションを行い、4 °Cに冷却した。アニーリング処理したサンプル(10 µl)を6% Tris - ホウ酸塩 - EDTA非変性ポリアクリルアミドゲル(Novex)で電気泳動し、乾燥してオートラジオグラフィーによって感光させた。

- アクチンPCRプライマーおよび標識されたネステッドプライマープローブを用いて、図3において使用されたcDNAライブラリーのPCRプロファイリングにより、 - アクチンのPCR産物が試験されたすべてのサンプルにおいて生じた。

#### 【0129】

図3に示されているように、プロテアーゼTのmRNAの分布は、特定の組織および細胞タイプに非常に限定されている。プロテアーゼTの転写物を発現することが見出された組織タイプは、胎盤、胃、精巣、網膜、繊維芽細胞、脊髄、および脳のいくつかの領域である。プロテアーゼTのmRNAはまた、白血球およびジャーカット(ATCC TIB-152) T細胞株においても見出される。

#### 【0130】

### 実施例3

#### 活性化プロテアーゼTを発現させるための構築物の作製

S1セリンプロテアーゼファミリーのメンバーは、非常に多くの場合、不活性なチモーゲン前駆体として合成され、そしてタンパク質分解的に活性になるためには限定的なタンパク質分解を必要とするので、本発明者らは、異種のセリンプロテアーゼcDNAを発現して、その一般的な活性化を可能にするチモーゲン活性化構築物を開発した。この構築物は、以前に記載されている(Ishii他(1993)、J. Biol. Chem. 268:9780~6)ように、分泌および抗体検出のためにそれぞれ、ウシプレプロラクチンシグナル配列がMoAb M2抗FLAG抗体エピトープと読み枠が一致して融合していることを特徴とする。重要なことに、この構築物はまた、ヒトトリプシノーゲンIに由来するエンテロキナーゼ切断部位(EK)を、シグナルペプチドと読み枠が一致して、その下流に含む。C端において、停止コドンの前には、ニッケル樹脂におけるアフィニティー精製のために、6個のヒスチジン(6XHis)コドンにコードするさらなる配列がそれぞれ存在する。特徴的なXbaI制限酵素部位が、6XHisアフィニティー標識配列のすぐ上流で、上記に記載されたPF EKプレプロ配列の下流にあり、この部位は、異種のセリンプロテアーゼcDNAの触媒作用ドメインの読み枠を合わせた挿入点である(図4)。上記に記載されたチモーゲン活

性化ベクターを改変されたショウジョウバエ発現プラスミドにクローン化して、PFEK-6XHIS-TAG64を作製した。

#### 【0131】

全長型プロテアーゼTcDNAの精製されたプラスミドDNAを、Advantage-GC cDNAポリメラーゼミックス(Clontech、Palo Alto、CA)を製造者の説明書に従って使用する100 $\mu$ lの調製的なPCR反応におけるテンプレートとして使用した。使用したプライマー：

配列番号5：ProtXba-U 5' - AGGATCTAGAGGAGGGCGAGTGGCCCTGGC - 3'

配列番号6：ProtXba-L 5' - GGGGTCTAGACTTCTGGCCGCCCAACCTCG - 3'

は、XbaIで切断可能な末端を含有し、そしてプロテアーゼTの触媒作用ドメインに隣接させて、プロテアーゼTのXbaI触媒作用カセットを作製するために設計された。調製的なPCR反応を、94 $^{\circ}$ Cで30秒間；63 $^{\circ}$ Cで30秒間；および68 $^{\circ}$ Cで1.5分間の18サイクルで行った。

#### 【0132】

調製的なPCR産物を、フェノール/CHCl<sub>3</sub>(1:1)で1回、そしてCHCl<sub>3</sub>で抽出し、その後、グリコーゲン(Boehringer Mannheim Corp.、Indianapolis、IN)およびキャリアを用いてEtOH沈殿した。沈殿したペレットを70%EtOHで洗浄し、真空乾燥して、80 $\mu$ lのH<sub>2</sub>O、10 $\mu$ lの10X制限緩衝液(No.2)および1 $\mu$ lの100xBSA(New England Biolabs、Beverly、MA)に再懸濁した。産物を200ユニットのXbaI制限酵素(New England Biolabs、Beverly、MA)を用いて37 $^{\circ}$ Cで3時間消化した。XbaI消化産物を、フェノール/CHCl<sub>3</sub>(1:1)で1回、そしてCHCl<sub>3</sub>で抽出し、EtOH沈殿して、70%EtOHで洗浄し、真空乾燥した。混入しているテンプレートプラスミドDNAから精製するために、産物を、TAE緩衝液(40mMのTris-酢酸塩、1mMのEDTA、pH8.3)中の1.0%低融点アガロース(Life Technologies、

Gaitheberg、MD)ゲルにより電気泳動して、ゲルから切り出した。切り出された産物の一部を、その後、XbaI消化、脱リン酸化およびゲル精製された上記のチモーゲン活性化ベクターとのゲル内連結のために使用した。構築物PF EK - プロテアーゼT - 6X HIS - TAG64を生じさせるために正しい向きで挿入されたプロテアーゼT Xbaカセットを含有するクローンを、NH<sub>2</sub>端のPF EKプレプロ配列およびC端の6X HISアフィニティー標識に対する正しい翻訳位置が維持されていることを確保するために配列分析によって確認した。

### 【0133】

#### 実施例4

##### 組換えプロテアーゼTの発現

PF EK - プロテアーゼT - HA6X HIS構築物を含む組換えバキュロウイルスを、製造者の説明書に従って、細菌の形質転換、選択、増殖、精製およびPCR確認により調製した。培養されたSf9昆虫細胞(ATCC CRL-1711)を精製されたバクミドDNAでトランスフェクションし、そして数日後、組換えPF EK - プロテアーゼT - HA6X HISバキュロウイルスを含有する調整培地を使用して、新しいSf9細胞に感染させた。感染細胞を24 ~ 27で48時間インキュベーションし、そして調整培地を使用して、PF EK - プロテアーゼT - HA6X HISチモーゲンを精製した。

### 【0134】

#### 実施例5

##### 組換えプロテアーゼTの精製および活性化

感染Sf9細胞から得られた調整培地を使用して、分泌された組換えPF EK - プロテアーゼT - HA6X HISチモーゲンを精製した。培地を、Centriprep濃縮器(Amicon Inc., Beverly, MA)を使用して5倍~10倍に濃縮した。150µlの50%Ni-NTAスラリー(Qiagen, Valencia, CA)を5ml~10mlの濃縮された培地に加え、4で60分間振とうすることによって混合した。チモーゲンが結合した樹脂を1.5mlの洗浄緩衝液(10mMのTris-HCl(pH8.0)、30

0 mMのNaClおよび15 mMのイミダゾール)で3回洗浄し、その後、ds H<sub>2</sub>Oによる1.5 mlの洗浄を行った。エンテロキナーゼによる切断を、20 mMのTris-HCl (pH 7.4)、50 mMのNaClおよび2.0 mMのCaCl<sub>2</sub>を含む緩衝液中で穏やかに振とうしながら、150  $\mu$ lの容量でエンテロキナーゼ (Novagen, Inc., Madison, WI; またはSigma, St. Louis, MO) をチモーゲン結合Ni-NTAビーズに加えることによって室温で一晩行った。その後、樹脂を1.5 mlの洗浄緩衝液で2回洗浄した。活性化されたプロテアーゼT-HA6XHISを溶出緩衝液(20 mMのTris-HCl (pH 7.8)、250 mMのNaClおよび250 mMのイミダゾール)により溶出させた。溶出したタンパク質濃度を、標準品としてウシ血清アルブミンを使用してMicroBCAキット(Pierce, Rockford, IL)によって測定した。活性化されたプロテアーゼT-HA6XHISのアミド分解活性を、表1および図6に示される合成基質からのパラ-ニトロアニリン(pNA)の放出によってモニターした。これらの研究において使用された発色性基質はすべて市販品であった(Bachem California Inc., Torrance, PA; American Diagnostica Inc., Greenwich, CT; Kabi Pharmacia Hepar Inc., Franklin, OH)。アッセイ混合物は、500  $\mu$ Mの発色性基質、ならびに10 mMのTris-HCl (pH 7.8)、25 mMのNaClおよび25 mMのイミダゾールを含有した。pNAの放出を、405 nm吸収フィルターを用いてマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Menlo Park, CA)において37 °Cで120分間にわたって測定した。初期反応速度(V<sub>max</sub>, mOD/分)を、Softmax(Molecular Devices, Menlo Park, CA)を使用して吸光度対時間のプロットから求めた。活性化されたプロテアーゼT-HA6XHISの様々な基質に対する比活性(nmol生成pNA/分/ $\mu$ gタンパク質)を表1に示す。測定可能な発色性アミド分解活性は、精製された非活性化型プロテアーゼT-HA6XHISチモーゲンでは検出されなかった。

## 【0135】

【表1】

表1  
比活性表

発色性基質	比活性
H-D-Pro-HHT-Arg-pNA	0.010±0.000
H-D-Lys(CBO)-Pro-Arg-pNA	0.057±0.022
H-DL-Val-Leu-Arg-pNA	0.016±0.003
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	N.A.
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	N.A.
Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA	N.A.

N.A. = 活性なし

## 【0136】

組換えプロテアーゼTの電気泳動およびウエスタンブロットング検出

精製されたPFEK-プロテアーゼT-6XHISチモーゲンまたは活性化されたプロテアーゼT-6XHISのサンプルを還元剤ジチオスレイトール(DTT)の存在下で変性して、SDS-PAGE(BioRad、Hercules、CA)によって分析し、クーマシーブリリアントブルーで染色した。ウエスタンブロットングのために、ゲルをHybondECLメンブラン(Amersham、Arlington Heights、IL)に電気転写した。トランスフェクションされたショウジョウバエ細胞から精製されたFLAG標識のPFEK-プロテアーゼT-6XHISチモーゲンが抗FlagM2抗体(Babco、Richmond、CA)により検出された。二次抗体は、ヤギ抗マウスIgG(H+L)、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合F(ab')<sub>2</sub>フラグメント(Boehringer Mannheim Corp.、Indianapolis、IN)であり、ECLキット(Amersham、Arlington Heights、IL)によって検出された。

## 【0137】

精製された組換えプロテアーゼPFEK-プロテアーゼT-6XHISチモーゲンおよび活性化されたプロテアーゼT-6XHISのポリアクリルアミドゲル分析およびウエスタンブロット分析は、図4の活性化構築物を使用してその発現

後に行われる。クーマシブリリアントブルーで染色される新規なセリンプロテアーゼPF EK - プロテアーゼT - 6X HISのサンプルを含むポリアクリルアミドゲルが示される(A)。相対的な分子量はタンパク質標準品(M)の位置によって示される。示されたレーンにおいて、精製されたチモーゲンは、チモーゲンをその活性形態に切断して活性化するために使用されたEKによる未処理(-)または消化(+ )のいずれかであった。抗FLAG MoAb M2でプローブされた、Aにおけるゲルのウエスタンブロットもまた示される(B)。これは、発現し、精製されたチモーゲンが定量的に切断されて、プロセッシングされた活性型プロテアーゼが生じたことを明らかにしている。FLAGエピトープはEKプロ配列のすぐ上流に位置している(図4)ので、EKによる切断により、小さすぎてポリアクリルアミドゲルに保持され得ない、従って+EKレーンで検出されないFLAG含有ポリペプチドが生じる。

#### 【0138】

##### 実施例6

##### プロテアーゼTの活性アッセイ

活性化されたセリンプロテアーゼのアミド分解活性は、市販されている合成基質(Bachem California Inc., Torrance, PA; American Diagnostica Inc., Greenwich, CT; Kabi Pharmacia Hepar Inc., Franklin, OH)からのパラ-ニトロフェノール(pNA)の放出によってモニターされる。アッセイ混合物は、500 uMの発色性基質、ならびに10 mMのTris-HCl (pH 7.8)、25 mMのNaClおよび25 mMのイミダゾールを含有する。pNAの放出は、405 nm吸収フィルターを用いてマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Menlo Park, CA)において37 °Cで120分間にわたって測定される。初期反応速度( $V_{max}$ , mOD/分)が、Softmax(Molecular Devices, Menlo Park, CA)を使用して吸光度対時間のプロットから求められる。本発明のセリンプロテアーゼを調節する化合物が、タンパク質分解活性の促進、またはより一般的にはタンパク質分解活性の阻害についてスクリーニン

グすることによって同定される。本発明の場合、発色活性が吸光度の増加によってモニターされるが、上記に記載されているように、タンパク質分解活性を測定する蛍光アッセイまたは他の方法（FRETなど）を用いることができる。化合物は、DMF、DMSO、メタノールなどの適切な溶媒に溶解され、通常の場合には100  $\mu$ Mを越えない濃度の範囲に水で希釈され、典型的には、プロテアーゼの1000倍の濃度（これに限定されない）で試験される。その後、化合物は、反応混合物に加える前にタンパク質保存溶液と混合される。あるいは、タンパク質および化合物溶液は独立して反応混合物に加えることができる。この場合、化合物は、プロテアーゼタンパク質の添加前または添加直後のいずれかで加えられる。

【0139】

参考文献

【0140】

【表2】

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-10.

Buroker-Kilgore, M., and Wang, K. K. W. (1993). A Coomassie Brilliant Blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. *Anal. Biochem.* **208**, 387-92.

Coolican, S. A., Haiech, J., and Hathaway, D. R. (1986). The role of subunit autolysis in activation of smooth muscle calcium-dependent proteases. *J. Biol. Chem.* **261**, 4170-6.

Davie, E. W., Fujikawa, K., and Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**, 10363-70.

Davies, B., Pickard, B., Steel, M., Morris, R., and Lathe, R. (1998). Serine proteases in rodent hippocampus. *J Biol Chem* **273**, 23004-11.

Emi, M., Nakamura, Y., Ogawa, M., Yamamoto, T., Nishide, T., Mori, T., and Matsubara, K. (1986). Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens. *Gene* **41**, 305-10.

Fukushima, D., Kitamura, N., and Nakanishi, S. (1985). Nucleotide sequence of cloned cDNA for human pancreatic kallikrein. *Biochemistry* **24**, 8037-43.

Hansson, L., Stroemqvist, M., Baeckman, A., Wallbrandt, P., Carlstein, A., and Egelrud, T. (1994). Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 19420-6.

Higgins, D. G., and Sharp, P. M. (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **5**, 151-3.

Ishii, K., Hein, L., Kobilka, B., and Coughlin, S. R. (1993). Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling. *J. Biol. Chem.* **268**, 9780-6.

Kohler, G., and Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* **6**, 511-9.

Little, S. P., Dixon, E. P., Norris, F., Buckley, W., Becker, G. W., Johnson, M., Dobbins, J. R., Wyrick, T., Miller, J. R., Mackellar, W., Hepburn, D., Corvalan, J., Mcclure, D., Liu, X., Stephenson, D., Clemens, J., and Johnstone, E. M. (1997).

Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 25135-25142.

Lonergan, S. M., Johnson, M. H., and Calkins, C. R. (1995). Improved calpain assay using fluorescein isothiocyanate-labeled casein. *J. Food Sci.* **60**, 72-3, 78.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Miller, J. S., Moxley, G., and Schwartz, L. B. (1990). Cloning and characterization of a second complementary DNA for human trypsin. *J. Clin. Invest.* **86**, 864-700.

Ng, M., and Auld, D. S. (1989). A fluorescent oligopeptide energy transfer assay with broad applications for neutral proteases. *Anal. Biochem.* **183**, 50-6.

Pearson, W. R., and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2444-8.

Pham, C. T. N., Thomas, D. A., Mercer, J. D., and Ley, T. J. (1998). Production of fully active recombinant murine granzyme B in yeast. *J. Biol. Chem.* **273**, 1629-1633.

Proud, D., and Kaplan, A. P. (1988). Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 49-83.

Reid, K. B. M., and Porter, R. R. (1981). The proteolytic activation systems of complement. *Annual Review of Biochemistry* **50**, 433-464.

Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-25.

Takayama, T. K., Fujikawa, K., and Davie, E. W. (1997). Characterization of the precursor of prostate-specific antigen Activation by trypsin and by human glandular kallikrein. *J. Biol. Chem.* **272**, 21582-21588.

Tomita, N., Izumoto, Y., Horii, A., Doi, S., Yokouchi, H., Ogawa, M., Mori, T., and Matsubara, K. (1989). Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic precymotrypsinogen cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 569-75.

Twining, S. S. (1984). Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* **143**, 30-4.

Von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**, 4683-90.

Wadstroem, T., and Smyth, C. J. (1973). Zymogram methods applied to thin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gel. In *Sci. Tools*, pp. 17-21.

Wang, Z.-m., Rubin, H., and Schechter, N. M. (1995). Production of active recombinant human chymase from a construct containing the enterokinase cleavage site of trypsinogen in place of the native propeptide sequence. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 681-4.

Yamaoka, K., Masuda, K.-i., Ogawa, h., Takagi, K.-i., Umemoto, N., and Yasuoka, S. (1998). Cloning and characterization of the cDNA for human airway trypsin-like protease. *J. Biol. Chem.* **273**, 11895-11901.

Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Kodama, S., Tsujimoto, M., Yamamura, Y., Tanaka, T., Nakazato, H., and Yamaguchi, N. (1997). Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim. Biophys. Acta* **1350**, 11-14.

Yu, J. X., Chao, L., Ward, D. C., and Chao, J. (1996). Structure and chromosomal localization of the human prostatic (PRSS8) gene. *Genomics* **32**, 334-40.

活性化された組換えプロテアーゼT - 6 X H I Sの比活性 ( n m o l 生成 p N A / 分 / u g タンパク質 ) が、分析された様々な基質について測定されて示される。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

新規なプロテアーゼTのcDNAのヌクレオチド配列 ( 配列番号1 ) およびアミノ酸配列 ( 配列番号7 ) を示す。

##### 【図2】

他のS1セリンプロテアーゼに対するプロテアーゼTのアミノ酸配列の系統樹を示す。

##### 【図3】

P C Rに基づく組織分布は、プロテアーゼTのmRNAが限定されていること

を示している。ゲルのオートラジオグラムが、遊離プローブ(F・P・)から電気泳動後に分離される標識されたネステイドプローブのハイブリダイゼーションによって検出される、プロテアーゼTに特異的なPCR産物の位置とともに示されている。分析された組織および細胞株のcDNAライブラリーは示されている通りである。

#### 【図4】

チモーゲン活性化構築物におけるプロテアーゼT触媒作用ドメインのヌクレオチド配列(配列番号8)およびアミノ鎖配列(配列番号9)を示す。

#### 【図5】

組換えプロテアーゼのPFEK-プロテアーゼT-6XHISのポリアクリルアミドゲル分析およびウエスタンブロット分析。クーマシーブリリアントブルーで染色された新規なセリンプロテアーゼPFEK-プロテアーゼT-6XHISサンプルを含むポリアクリルアミドゲルが示される(左側の1、2)。相対的な分子量がタンパク質標準品(M)の位置によって示される。示されたレーンにおいて、精製されたチモーゲンは、チモーゲンをその活性型形態に切断して活性化するために使用されたEKによる未処理(-)または消化(+ )のいずれかであった。抗FLAGモノクローナル抗体M2でプローブされたゲルのウエスタンブロットもまた示される(右側の1、2)。これにより、発現し、精製されたチモーゲンが定量的に切断され、プロセッシングされた活性型プロテアーゼが生じていることが明らかにされる。FLAGエピトープはEKプロ配列のすぐ上流に存在するので、EKによる切断により、小さすぎてポリアクリルアミドゲルに保持され得ない、従って+EKレーンにおいて検出されないFLAG含有ポリペプチドが生じている。

#### 【図6】

活性化構築物から発現、精製および活性化された組換えプロテアーゼT-6XHISの機能的なアミド分解活性を、発色性基質を使用して測定した。

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Andrade-Gordon, Patricia  
Darrow, Andrew  
Qi, Jenson

<120> DNA encoding the human serine protease T

<130> ORT-1032

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1110

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaccacggcc ctgcgcccc gccaggcctg aggacatgag gggcccgccg gcggtgccgc 60  
tctgtctgct gctgtgtttt gggctctcaga gggccaaggc agcaacagcc tgtggtcgcc 120  
ccaggatgct gaaccgaatg gtggcggggc aggacacgca ggagggcgag tggcctggc 180  
aagtcagcat ccagcgcaac ggaagccact tctgcggggg cagcctcacc gcggagcagt 240

gggtcctgac ggctgcgcac tgcttccgca acacctctga gacgtccctg taccaggtcc 300  
tgctgggggc aaggcagcta gtgcagccgg gaccacacgc tatgtatgcc cgggtgaggc 360  
aggtggagag caaccccctg taccagggca cggcctccag cgctgacgtg gccctgggtg 420  
agctggaggc accagtgcc ttcaaccaatt acatcctccc cgtgtgctg cctgacccct 480  
cggatgatctt tgagacgggc atgaaactgct gggctcactgg ctggggcagc cccagtgagg 540  
aagacctcct gcccgaaacg cggatcctgc agaaactgc tgtgccatc atcgacacac 600  
ccaagtgcaa cctgctctac agcaaagaca ccgagtttg ctaccaacc aaaaccatca 660  
agaatgacat gctgtgcgcc ggcttcgagg agggcaagaa ggatgcctgc aagggcgact 720  
cgggcggccc cctgggtgtc ctcgtgggtc agtcgtggct gcaggcgggg gtgatcagct 780  
ggggtgaggg ctgtgcccgc cagaacgcc caggtgtcta catccgtgtc accgccacc 840  
acaactggat ccacggatc atccccaaac tgcagttcca gccagcgagg ttgggcggcc 900  
agaagtgaga cccccgggc caggagcccc ttgagcagag ctctgcacc agcctgccc 960  
cccacacat cctgctggtc ctcccagcgc tgctgttga cctgtgagcc ccaccagact 1020  
catttgtaaa tagcgtcctt tctcccctc tcaaataccc ttattttatt tatgtttctc 1080  
ccaataaaaa ccagcctgt gtgccagctg 1110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 2

gccaggcctg aggacatgag

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 3

tgcgctggat gctgacttgc

20

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Nested probe

<400> 4

ccaggatgct gaaccgaatg gtgggcgggc aggacacgca

40

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 5

aggatctaga ggagggcgag tggccttggc

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 6

ggggtctaga cttctggccg ccaacctcg

30

<210> 7

<211> 290

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Arg Arg Pro Ala Ala Val Pro Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gly

1

5

10

15

Ser Gln Arg Ala Lys Ala Ala Thr Ala Cys Gly Arg Pro Arg Met Leu

20

25

30

Asn Arg Met Val Gly Gly Gln Asp Thr Gln Glu Gly Glu Trp Pro Trp

35

40

45

Gln Val Ser Ile Gln Arg Asn Gly Ser His Phe Cys Gly Gly Ser Leu

50

55

60

Ile Ala Glu Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Asn Thr

65

70

75

80

Ser Glu Thr Ser Leu Tyr Gln Val Leu Leu Gly Ala Arg Gln Leu Val

85

90

95

Gln Pro Gly Pro His Ala Met Tyr Ala Arg Val Arg Gln Val Glu Ser

100

105

110

Asn Pro Leu Tyr Gln Gly Thr Ala Ser Ser Ala Asp Val Ala Leu Val

115

120

125

Glu Leu Glu Ala Pro Val Pro Phe Thr Asn Tyr Ile Leu Pro Val Cys

130

135

140

Leu Pro Asp Pro Ser Val Ile Phe Glu Thr Gly Met Asn Cys Trp Val

145

150

155

160

Thr Gly Trp Gly Ser Pro Ser Glu Glu Asp Leu Leu Pro Glu Pro Arg

165

170

175

Ile Leu Gln Lys Leu Ala Val Pro Ile Ile Asp Thr Pro Lys Cys Asn

180

185

190

Leu Leu Tyr Ser Lys Asp Thr Glu Phe Gly Tyr Gln Pro Lys Thr Ile

195

200

205

Lys Asn Asp Met Leu Cys Ala Gly Phe Glu Glu Gly Lys Lys Asp Ala

210

215

220

Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Val Gly Gln Ser

225

230

235

240

Trp Leu Gln Ala Gly Val Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Gln

245

250

255

Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Arg Val Thr Ala His His Asn Trp Ile

260

265

270

His Arg Ile Ile Pro Lys Leu Gln Phe Gln Pro Ala Arg Leu Gly Gly

275

280

285

Gln Lys

290

<210> 8

<211> 1130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Fusion gene of

Protease T in a zymogen activation vector

<400> 8

gaattcacca ccatggacag caaagggttcg tcgcagaaat cccgcctgct cctgctgctg 60

gtggtgtcaa atctactctt gtgccaggggt gtggtctccg actacaagga cgacgacgac 120  
gtggaogcgg ccgctcttgc tgcccccttt gatgatgatg acaagatcgt tgggggctat 180  
gctctagagg agggcgagtg gccctggcaa gtcagcatcc agcgcaacgg aagccacttc 240  
tgogggggca gctcatcgc ggagcagtgg gtcctgacgg ctgcgcaactg cttccgcaac 300  
acctctgaga cgtccctgta ccaggctctg ctgggggcaa ggcagctagt gcagccggga 360  
ccacaecgta tgtatgcccg ggtgagggcag gtggagagca accccctgta ccagggcacg 420  
gctccagcg ctgacgtggc cctggtggag ctggaggcac cagtgcctt caccaattac 480  
atctccccg tgtgctgcc tgaccctcgg gtgatctttg agacgggcat gaactgctgg 540  
gtcactggct ggggcagccc cagtgaggaa gacctctgc ccgaaccgcg gatcctgcag 600  
aaactcgtg tgcccatcat cgacacacc aagtgaacc tgctctacag caaagacacc 660  
gagtttgct accaaccocaa aaccatcaag aatgacatgc tgtgcgccgg ctteggaggag 720  
ggcaagaagg atgcctgcaa gggcgactcg ggcggccccc tgggtgtgct cgtgggtcag 780  
tcgtggctgc aggcgggggt gatcagctgg ggtgagggct gtgcccgcca gaaccgocca 840  
ggtgtctaca tccgtgtcac cgcaccacc aactggatcc atcggatcat ccccaactg 900  
cagttccagc cagcgagggt gggcgccag aagtctagac atcaccatca ccatcactag 960  
cggcgccttc cctttagtga gggttaatgc ttcgagcaga catgataaga tacattgatg 1020

agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg 1080

atgctattgc tttatttcta accattataa gctgcaataa acaagttgac 1130

<210> 9

<211> 315

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Fusion Protein

of Protease T in a zymogen activation construct

<400> 9

Met Asp Ser Lys Gly Ser Ser Gln Lys Ser Arg Leu Leu Leu Leu Leu

1

5

10

15

Val Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys Gln Gly Val Val Ser Asp Tyr Lys

20

25

30

Asp Asp Asp Asp Val Asp Ala Ala Ala Leu Ala Ala Pro Phe Asp Asp

35

40

45

Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Ala Leu Glu Glu Gly Glu Trp Pro

50

55

60

Trp Gln Val Ser Ile Gln Arg Asn Gly Ser His Phe Cys Gly Gly Ser

65

70

75

80

Leu Ile Ala Glu Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Asn

85

90

95

Thr Ser Glu Thr Ser Leu Tyr Gln Val Leu Leu Gly Ala Arg Gln Leu

100

105

110

Val Gln Pro Gly Pro His Ala Met Tyr Ala Arg Val Arg Gln Val Glu

115

120

125

Ser Asn Pro Leu Tyr Gln Gly Thr Ala Ser Ser Ala Asp Val Ala Leu

130

135

140

Val Glu Leu Glu Ala Pro Val Pro Phe Thr Asn Tyr Ile Leu Pro Val

145

150

155

160

Cys Leu Pro Asp Pro Ser Val Ile Phe Glu Thr Gly Met Asn Cys Trp

165

170

175

Val Thr Gly Trp Gly Ser Pro Ser Glu Glu Asp Leu Leu Pro Glu Pro

180

185

190

Arg Ile Leu Gln Lys Leu Ala Val Pro Ile Ile Asp Thr Pro Lys Cys

195 200 205

Asn Leu Leu Tyr Ser Lys Asp Thr Glu Phe Gly Tyr Gln Pro Lys Thr

210 215 220

Ile Lys Asn Asp Met Leu Cys Ala Gly Phe Glu Glu Gly Lys Lys Asp

225 230 235 240

Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Val Gly Gln

245 250 255

Ser Trp Leu Gln Ala Gly Val Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg

260 265 270

Gln Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Arg Val Thr Ala His His Asn Trp

275 280 285

Ile His Arg Ile Ile Pro Lys Leu Gln Phe Gln Pro Ala Arg Leu Gly

290 295 300

Gly Gln Lys Ser Arg His His His His His His

305 310 315

【図1】

**FIG. 1**

ヌクレオチド配列およびA A配列

プロテアーゼ T の核酸配列 (配列番号 1)

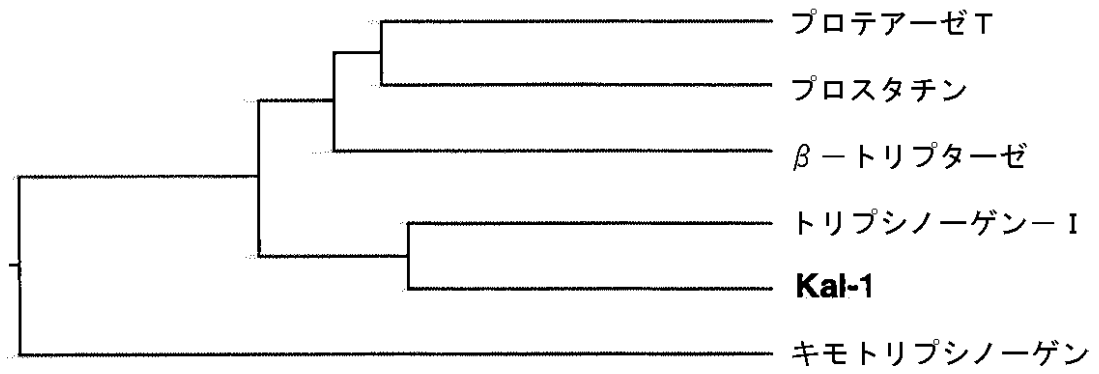
GACCACGGCCCTGCGCCCCAGCCAGGCTGAGGACATGAGGCGGCCGGCGCGGTGCCGC  
 TCCTGCTGCTGCTGIGTTTTGGGTCTCAGAGGGCCAAGGCAGCAACAGCCTGTGGTCCG  
 CCAGGATGCTGAACCGAATGGTGGGCGGGCAGGACACGCAGGAGGGCGAGTGGCCCTGGC  
 AAGTCAGCATCCAGCGCAACCGAAGCCACTTCTGCGGGGGCAGCCTCATCGCGGAGCAGT  
 GGGTCCCTGACGGCTGCGCACTGCTTCCGCAACACCTCTGAGACGTECCTGTACCAGGTCC  
 TGCTGGGGGCAAGGCAGCTAGTGCAGCCGGACCACACGCTATGTATGCCCCGGGTGAGGC  
 AGGTGGAGAGCAACCCCTGTACCAGGGCACGGCTCCAGCGCTGACGTGGCCCTGGTGG  
 AGCTGGAGGCACCAGTGGCCCTCACCAATTACATCCTCCCCGTGTGCCTGCCTGACCCCT  
 CGGTGATCTTTGAGACGGGCATGAACTGCTGGGTCACTGGCTGGGGCAGCCCCAGTGAGG  
 AAGACCTCCTGCCCCGAACCGCGGATCCTGCAGAACTCGCTGTGCCATCATCGACACAC  
 CCAAGTGCAACCTGCTCTACAGCAAAGACACCGAGTTTGGCTACCAACCCAAAACCATCA  
 AGAATGACATGCTGTGCGCCGGCTTCGAGGAGGGCAAGAAGGATGCCTGCAAGGGCGACT  
 CGGGCGGCCCCCTGGTGTGCCCTCGTGGGTGAGTGGTGGCTGCAGGCGGGGGTGATCAGCT  
 GGGGTGAGGGCTGTGCCCGCCAGAACCGCCAGGTGTCTACATCCGTGTACCGCCACC  
 ACAACTGGATCCATCGGATCATCCCCAAACTGCAGTTCCAGCCAGCGAGGTGGGGCGGCC  
 AGAAGTGAGACCCCCGGGGCCAGGAGCCCCTTGAGCAGAGCTCTGCACCCAGCCTGCCCG  
 CCCACACCATCCTGCTGGTCCCTCCAGCGCTGCTGTGACCTGTGAGCCCCACCAGACT  
 CATTTGTAAATAGCGCTCCTTCCCTCCCCCTCAAAATACCCTTATTTTATTTATGTTTCTC  
 CCAATAAAAACCCAGCCTGTGTGCCAGCTG

プロテアーゼ T のアミノ酸配列 (配列番号 7)

MRRPAAVPLLLLLLFCFGSQRKAATACGRPRMLNRMVGGQDTQEGEWPWQVSIQRNGSHFC  
 GGSLLIAEQWVLTAAHCFRNTSETSLYQVLLGARQLVQPGPHAMYARVRQVESNPLYQGT  
 SSADVALVELEAPVPFTNYILPVCLPDPSVIFETGMNCWVTGWGSPSEEDLLPEPRILQK  
 LAVPIIDTPKCNLLYSKDTEFGYQPKTIKNDMLCAGFEEGKKDACKGDSGGPLVCLVQGS  
 WLQAGVISWGEGCARQNRPGVYIRVTAHNNWIHRIIPKLFQPARLGGQK

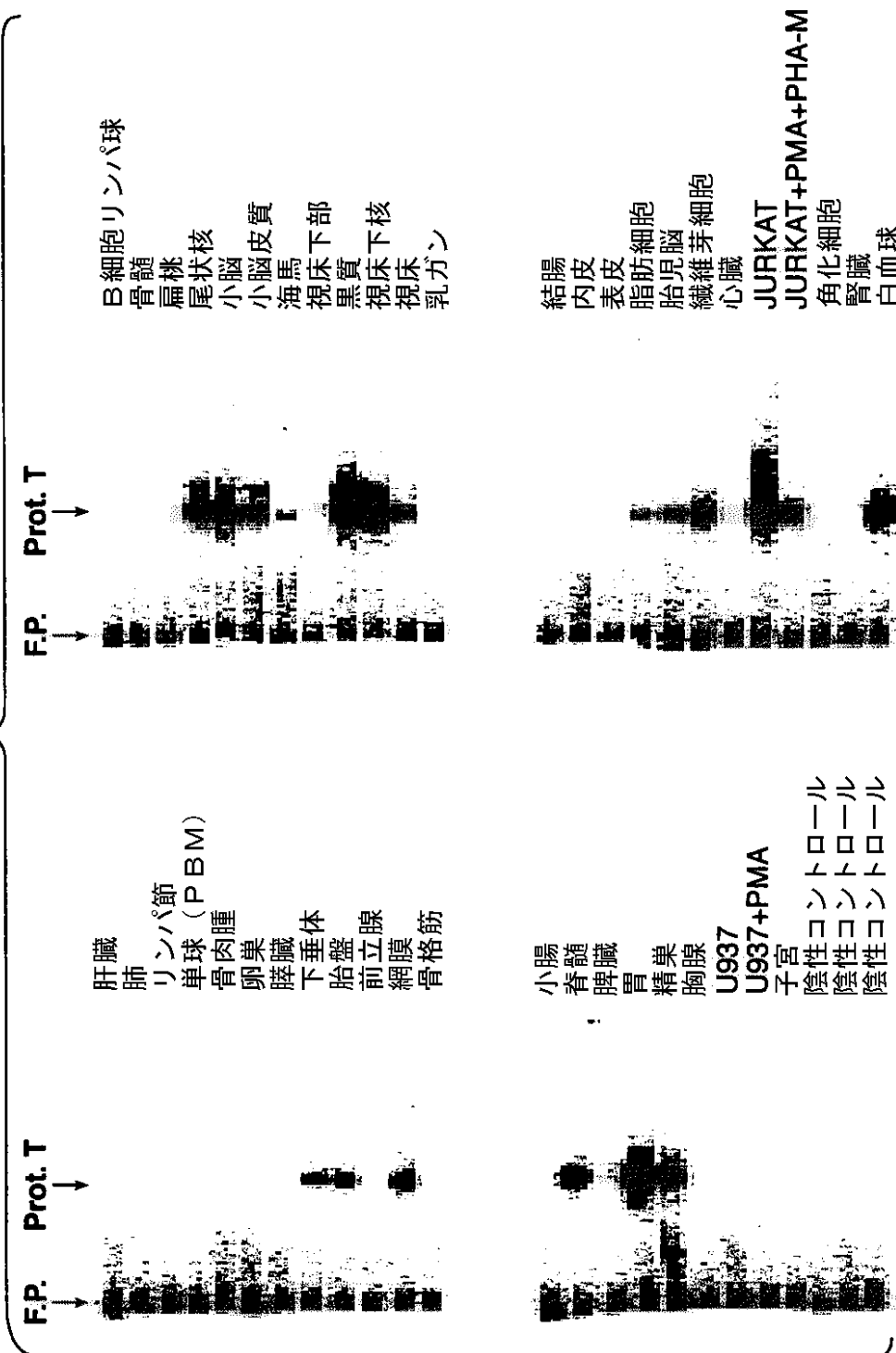
【図2】

**FIG. 2**



【図3】

FIG. 3



【図4】

**FIG. 4**

## 融合タンパク質

PFEK-PROTT-HIS融合タンパク質の核酸配列  
(配列番号8)

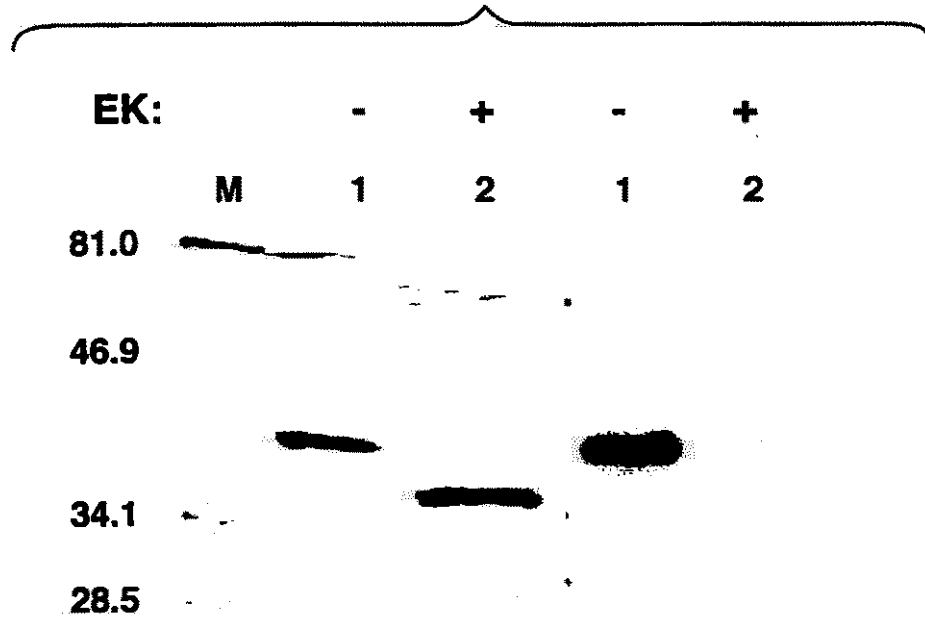
GAATTCACCACCATGGACAGCAAAGGTTGCTCGCAGAAATCCCGCCTGCTCCTGCTGCTG  
GTGGTGTCAAATCTACTCTTGTGCCAGGGTGTGGTCTCCGACTACAAGGACGACGACGAC  
GTGGACGCGGCCGCTCTTGTGCTGCCCCCTTTGATGATGATGACAAGATCGTTGGGGGCTAT  
GCTCTAGAGGAGGGCGAGTGGCCCTGGCAAGTCAGCATCCAGCGCAACGGAAGCCACTTC  
TGCGGGGGCAGCCTCATCGCGGAGCAGTGGGTCTGACCGCTGCGCACCTGCTTCCGCAAC  
ACCTCTGAGACGTTCCCTGTACCAGGTCTGCTGGGGGCAAGGCAGCTAGTGCAGCCGGGA  
CCACACGCTATGTATGCCCGGGTGAGGCAGGTGGAGAGCAACCCCTGTACCAGGGCAG  
GCCTCCAGCGCTGACGTGGCCCTGGTGGAGCTGGAGGCACCAGTGCCCTTACCAATTAC  
ATCCTCCCCGTGTGCCTGCCTGACCCCTCGGTGATCTTTGAGACGGGCATGAACTGCTGG  
GTCACCTGGCTGGGGCAGCCCCAGTGGGAAGACCTCTGCCCCGAACCGCGGATCCTGCAG  
AAACTCGCTGTGCCCATCATCGACACACCCAAAGTGCAACCTGCTCTACAGCAAAGACACC  
GAGTTTGGCTACCAACCCAAAACCATCAAGAATGACATGCTGTGCGCCGGCTTCGAGGAG  
GGCAAGAAGGATGCCCTGCAAGGGCGACTCGGGCGGCCCTGGTGTGCCTCGTGGGTGAG  
TCGTGGCTGCAGCGGGGGTGTATCAGCTGGGGTGGAGGCTGTGCCCCGAGAACCGCCCA  
GGTGTCTACATCCGTGTCAACGCCACCACAACCTGGATCCATCGGATCATCCCCAAACTG  
CAGTCCAGCCAGCGAGGTGGGGCGCCAGAAGTCTAGACATCACCATCACCATCACTAG  
CGGCCGCTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATGCTTTCGAGCAGACATGATAAGATACATGATG  
AGTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAATAAATAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG  
ATGCTATTTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTGAC

PFEK-PROTT-HIS融合タンパク質のアミノ酸配列  
(配列番号9)

MDSKGSSQKSRLLLLLLVVSNLLLCQGVVSDYKDDDDVDAAALAAPFDKKIVGGYALEE  
GEWPWQVSIQRNGSHFCGSLIAEQWVLTAAHCFRNTSETSLYQVLLGARQLVQPGPHAM  
YARVRQVESNPLYQGTASSADVALVELEAPVPFTNYLLPVCLPDPSVIFETGMNCWVTGW  
GSPSEEDLLPEPRILQKLAVPIIDTPKCNLLYSKDTEFGYQPKTIKNDMLCAGFEEGKGD  
ACKGDSGGPLVCLVGSWLQAGVTSWGEQCARQNRPGVYIRVTAHHNWIHRIIPKLQFQP  
ARLGGQKSRHHHHH

【図5】

# FIG. 5



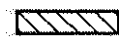


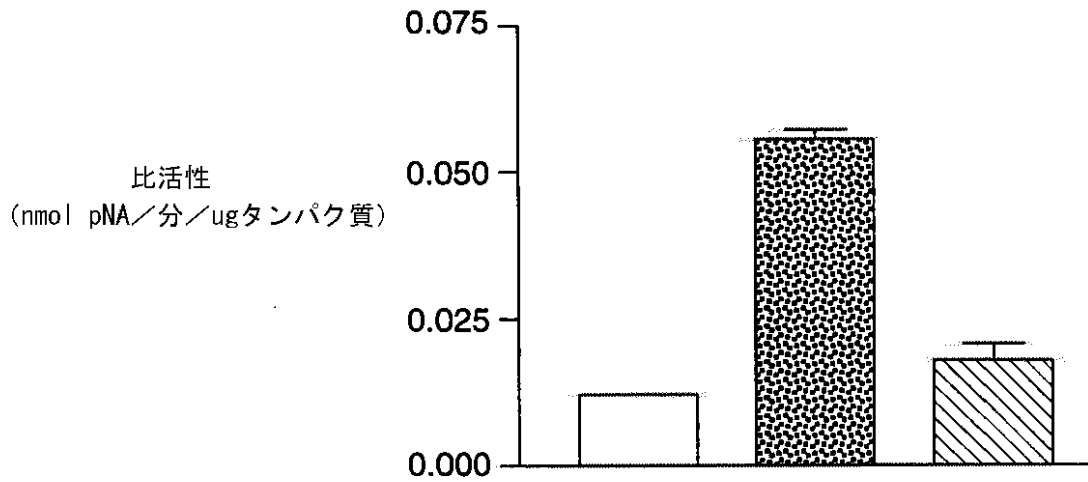
プロテアーゼ：PFEK-プロテアーゼT-HIS

【図6】

# FIG. 6

プロテアーゼTのプロテアーゼ活性

-  H-D-Pro-HHT-Arg-pNA
-  H-D-Lys(CBO)-Pro-Arg-pNA
-  H-DL-Val-Leu-Arg-pNA



## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/23823
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C12N 9/64, 15/57, 15/62, 15/79, 15/85; A61K 38/48 US CL : 435/69.1, 69.7, 226, 252.3, 320.1; 536/23.2, 23.4; 514/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 69.7, 226, 252.3, 320.1; 536/23.2, 23.4; 514/2		
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) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 98/36054 A1 (AMRAD OPERATIONS PTY. LTD.) 20 August 1998 (20.08.98) pages 30-35, 52-53, Figure 20C and SEQ ID NO:30	1-12, 14, 15 & 20-23 17, 18 & 24-27
X — Y	WO 99/35170 A2 (GENENTECH, INC.) 15 July 1999 (15.07.99), pages 40-50, 98, 112-115, and SEQ ID NO:12.	1-11 & 14 17, 18 & 20-27
X — Y	EP 890646 A2 (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 13 January 1999 (13.01.1999), pages 6-10, 30-34 and SEQ ID NO:2.	1-12, 14, 15, 22 & 23 17, 18, 20, 21 & 24-27
Y	US 5,834,290 A1 (EGELRUD et al.) 10 November 1998 (10.11.98), cols. 20-28	17, 18, 20, 24 & 27
Y	US 5,763,257 A1 (BOTT et al.) 09 June 1998 (09.06.98), cols. 2-8, 13-82, Figures 23, 32 and 33, and claim 5	25 & 26
X, P — Y, P	WO 99/57144 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 11 November 1999 (11.11.99), pages 4-37, 41-47, and 56 and SEQ IDs NOs:64 and 129	1-12, 14, 15 & 20-23 17, 18 & 24-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"E" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 20 July 2001 (20.07.2001)		Date of mailing of the international search report 08 AUG 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer TERRY J. DEY WILLIAM MOORE PARALEGAL SPECIALIST TECHNOLOGY CENTER 1600 Telephone No. (703)308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. onal application No.

PCT/US00/23823

**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.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/23823

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING:** This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claims 1-11, 14, 21-24 and 27, drawn to a first product, a nucleic acid molecule encoding a human protease T and to a method of making the encoded protease T utilizing the nucleic acid molecule and ancillary products such as expression vectors and recombinant host cells, as well as the encoded protease T, kits comprising the nucleic acid or the protease, to a first composition, a pharmaceutical composition comprising the protease, and to a first method of use of that composition in a method for treating an imbalance of desquamation.

Group 2, claims 12 and 13, drawn to second product, an antibody immunologically reactive with a protease T.

Group 3, claims 15 and 16, drawn to a second use of the protease T in an assay method to identify compounds that modulate protease T activity.

Group 4, claims 17-20, drawn to a third product, an unspecified compound capable of modulating the activity of protease T as well as to a first method of use of the unspecified compound in a method of treating a condition mediated by protease T.

Group 5, claims 25 and 26, drawn to a second composition comprising a protease T and to a separate, industrial, method of use of the second composition.

The inventions listed as Group 1 and Groups 2-5 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The nucleic acid of Group 1 is structurally unrelated to the antibody of Group 2 and the unspecified compound of Group 4, thus can share no same or corresponding special technical feature. The method of use of a protease T and the pharmaceutical composition of Group 1 are incompatible with the method of use of a protease T of Group 3 and the industrial composition comprising, and method of use of, the protease T, i.e., no two methods can be practiced jointly thus cannot share a same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group 2 and Groups 3-5 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The antibody of Group 2 is structurally unrelated to the unspecified compound of Group 4, thus can share no same or corresponding special technical feature. The antibody of Group 2 cannot, as claimed, be utilized in methods or a composition of Group 3 and 5, thus cannot share a same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group 3 and Groups 4 and 5 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The method of Group 3 is, as claimed, only specifically requires the protease T, thus the unspecified compound that is the product of Group 4 cannot have any same or corresponding technical feature which is special with respect to the method of Group 3. The method of Group 3 is incompatible with the industrial composition comprising, and method of use of, the protease T, of Group 5, i.e., the two methods can be practiced jointly thus cannot share a same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group 4 and Group 5 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The unspecified compound of Group 4 is not, as claimed, required for the practice of the method of Group 5, thus cannot share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	1/04	A 6 1 P	17/00	4 B 0 6 5
	15/08		25/00	4 C 0 8 3
	17/00		27/02	4 C 0 8 4
	25/00		37/02	4 C 0 8 7
	27/02		43/00	1 1 1 4 H 0 0 3
	37/02	C 0 7 K	16/40	4 H 0 4 5
	43/00	C 1 1 D	3/386	
C 0 7 K	16/40	C 1 2 N	1/15	
C 1 1 D	3/386		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19		9/76	
	1/21	C 1 2 Q	1/37	
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
	9/76		33/50	Z
C 1 2 Q	1/37		33/53	D
G 0 1 N	33/15	A 6 1 K	35/76	
	33/50		48/00	
	33/53	C 1 2 P	21/08	
// A 6 1 K	35/76	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	48/00		5/00	A
C 1 2 P	21/08	A 6 1 K	37/547	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 アンドレイド - ゴードン, パトリシア  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・18938、  
 ドイルズタウン、ウインデイ・ラン・301

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03 FB07  
4B024 AA01 AA11 BA14 CA01 CA04  
CA11 HA01  
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03 LL04  
4B063 QA01 QA18 QQ36 QR16 QS03  
QX01 QX02 QX07  
4B064 AG27 CA21 DA13  
4B065 AB01 BA02 CA33 CA44 CA46  
CA50 CA57  
4C083 AD47 CC02 CC23 CC38  
4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA13  
AA17 BA01 BA08 BA22 CA18  
DC03 MA01 NA14 ZA011  
ZA811 ZA891 ZB071 ZC192  
ZC202 ZC412  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA01  
NA14 ZA01 ZA81 ZA89 ZB07  
ZC19 ZC20 ZC41  
4H003 DA01 DA02 DA05 EC02 FA47  
4H045 AA11 DA76 EA50

专利名称(译)	编码人丝氨酸蛋白酶T的DNA		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003532375A</a>	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	JP2001520841	申请日	2000-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔药品公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔杉机俞蒂卡尔酒店股份有限公司每次的Rete		
[标]发明人	ダロウアンドリユーエル チーチエンセン アンドレイドゴードンパトリシア		
发明人	ダロウ,アンドリユー・エル チー,チエンセン アンドレイド-ゴードン,パトリシア		
IPC分类号	G01N33/50 A61K8/00 A61K8/72 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/48 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P15/08 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P37/02 A61P43/00 A61Q5/02 C07K16/40 C11D3/386 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N9/76 C12N15/09 C12N15/57 C12P21/08 C12Q1/37 G01N33/15 G01N33/53 A61K7/00 A61K7/075		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P15/08 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 C12N9/6424		
FI分类号	A61K7/00.J A61K7/075 A61K45/00 A61P1/04 A61P15/08 A61P17/00 A61P25/00 A61P27/02 A61P37/02 A61P43/00.111 C07K16/40 C11D3/386 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/76 C12Q1/37 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D A61K35/76 A61K48/00 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/547		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL04 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ36 4B063/QR16 4B063/QS03 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA21 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA50 4B065/CA57 4C083/AD47 4C083/CC02 4C083/CC23 4C083/CC38 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/DC03 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZB071 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC412 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZB07 4C087/ZC19 4C087/ZC20 4C087/ZC41 4H003/DA01 4H003/DA02 4H003/DA05 4H003/EC02 4H003/FA47 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50		
优先权	09/386653 1999-08-31 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

在这里,我们描述了一种编码新型丝氨酸蛋白酶的cDNA的分子生物学鉴定,我们将其称为蛋白酶T。推导的氨基酸序列编码290个氨基酸的前蛋白形式,并且其与其他特征明确的丝氨酸蛋白酶的比对表明,蛋白酶T是S1丝氨酸蛋白酶家族的成员。发明人发现,蛋白酶T mRNA在胃,睾丸,视网膜,成纤维细胞,脊髓和脑的几个区域中表达。蛋白酶T mRNA也存在于白细胞和Jurkat (ATCC TIB-152) T细胞系中。因此,该蛋白酶可能与胃,睾丸,视网膜,皮肤病,神经系统/神经变性和/或免疫系统疾病有关。蛋白酶T基因位于胰蛋白酶基因座附近的人类染色体16p13.1。对本发明人生产的具有酶活性的蛋白酶T进行进一步的生化研究,以鉴定生理底物和特异性调节剂。

発色性基質	比活性
H-D-Pro-HHT-Arg-pNA	0.010±0.000
H-D-Lys(CBO)-Pro-Arg-pNA	0.057±0.022
H-DL-Val-Leu-Arg-pNA	0.016±0.003
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	N.A.
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	N.A.
Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA	N.A.

N.A. = 活性なし