

(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 - 506017

(P2003 - 506017A)

(43)公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		16/40	4 B 0 2 4
16/40		19/00	4 B 0 5 0
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全 57数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 509750(P2001 - 509750)

(86)(22)出願日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月10日(2002.1.10)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/06211

(87)国際公開番号 W001/004141

(87)国際公開日 平成13年1月18日(2001.1.18)

(31)優先権主張番号 99113428.9

(32)優先日 平成11年7月12日(1999.7.12)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト
ベシュレンクテル ハフトング
MERCK PATENT GESEL
LSCHAFT MIT BESCHR
AENKTER HAFTUNG
ドイツ連邦共和国 デー - 64293 ダルムシ
ユタット フランクフルター シュトラ
ーセ 250

(72)発明者 センデルマン、ブリタ
ドイツ連邦共和国 デー - 64285 ベインベ
ルグシュトラーセ 6アー

(74)代理人 弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 セリバンクリン

(57)【要約】

セリバンクリン・ポリペプチドおよびそのポリヌクレオチド、ならびにかかるポリペプチドを組換え技術によって製造するための方法が開示される。また、セリバンクリン・ポリペプチドおよびそのポリヌクレオチドを、診断アッセイにおいて用いるための方法も開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチド；

(b) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有する単離されたポリペプチド；および

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列；ならびに

(e) (a)～(d)に記載される各ポリペプチドのフラグメントおよび変異体

からなる群の1つから選択される単離されたポリペプチド。

【請求項2】 配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 配列番号：2のポリペプチド配列である、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項4】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%の同一性を有する単離されたポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：1の配列、または少なくとも15塩基を有するそのフラグメントを有する標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件

の下で、ライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、少なくとも100塩基のヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のポリヌクレオチドのRNA等価体であるポリヌクレオチド；

または前記単離されたポリヌクレオチドに対して、相補的なポリヌクレオチド配列、ならびに前記ポリヌクレオチドの変異体およびフラグメントであるか、あるいは、その全長にわたって、前記ポリヌクレオチドに対して相補的であるかのポリヌクレオチド

からなる群の1つから選択される単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1の単離されたポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；および

(d) 配列番号：2のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドからなる群から選択される、請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 その発現ベクターが適合性宿主細胞に存在する際に、請求項1に記載のポリペプチドを産生し得るポリヌクレオチドを含んでなる発現システム。

【請求項7】 請求項1に記載されるポリペプチドを発現している、請求項6に記載される発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項8】 請求項1に記載されるポリペプチドを製造するための方法であって、

請求項7に記載される宿主細胞を前記ポリペプチドの産生に十分な条件の下で培養して、前記ポリペプチドを培養培地から回収する工程を含んでなる方法。

【請求項9】 免疫グロブリンのFc領域と、請求項1に記載されるポリペプチドのいずれか1つとで構成される融合タンパク質。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか一項に記載されるポリペプチドに

対する、免疫特異的な抗体。

【請求項11】 請求項1に記載されるポリペプチドの機能または濃度を誘起または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

(a) 前記ポリペプチド(または前記ポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合タンパク質に対する候補化合物の結合を、該候補化合物と直接的または間接的に結合している標識によって、定量的または定性的に測定または検出すること;

(b) 標識された競合剤の存在下に、前記ポリペプチド(または前記ポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合タンパク質に対する、候補化合物の結合の競合を測定すること;

(c) 該ポリペプチドを発現している細胞または細胞膜に適合する検出システムを使用して、前記ポリペプチドの活性化または阻害によって発生されるシグナルを該候補化合物が生じさせるか否かを試験すること;

(d) 候補化合物を、請求項1に記載されるポリペプチドを含有する溶液と混合して混合物を作製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定し、そして、該混合物の活性を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較すること;
または

(e) 前記ポリペプチドをコードするmRNAまたは前記ポリペプチドの細胞における産生に対する候補化合物の作用を、例えば、ELISAアッセイを使用して検出すること;

からなる群から選択される方法、 および

(f) 生物工学的または化学的な標準的な手法に従って、前記化合物を製造すること

を含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、新たに同定されたポリペプチド、および、以降、場合によって「セリパンクリン」と称する、かかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断、および治療において潜在的に有用な、アゴニスト、アンタゴニストと成り得る化合物の同定におけるそれらの使用、ならびに、かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドの製造に関する。

【0002】**(発明の背景)**

医薬探索プロセスは、現在、「機能的ゲノミクス」、すなわち、ハイ・スループットな、ゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を取り込むことで、根本的な革新を経験しつつある。遺伝子および遺伝子産物を治療の標的と同定する手段として、この方法は、迅速に、「ポジショナル・クローニング」に基づく従前の方法に取って代わりつつある。表現型、すなわち、生物学的機能または遺伝子的疾患を同定し、その後、その遺伝子地図の位置に基づいて、その原因となる遺伝子の探知がなされる。

【0003】

機能的ゲノミクスは、ハイ・スループットなDNA配列決定技術、および現に入手可能な多くの分子生物学データベースから、潜在的な関心を有する遺伝子配列を同定するためのバイオ・インフォマティクスの様々なツールに、大きく頼っている。医薬探索の標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/タンパク質を同定し、その特定を行うことが引き続き求められている。

【0004】**(発明の概要)**

本発明は、セリパンクリン、特に、セリパンクリン・ポリペプチドおよびセリパンクリン・ポリヌクレオチド、組換え材料、ならびにそれらの調製方法に関する。かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それらに限定されないものの、ガン、骨粗鬆症、異常な傷害治癒、血管形成、炎症性疾患、慢性閉塞性肺

疾患、糖尿病、関節炎、発作および心臓血管疾患を含む、以降「本発明にかかる疾患」と呼ぶ特定の疾患を処置する方法に関連して、重要である。さらなる形態において、本発明は、本発明によって提供される材料を使用して、アゴニストおよびアンタゴニスト（例えば、阻害剤）を同定する、ならびに、同定された化合物により、セリパンクリンの不均衡に付随する症状を処置するための方法に関する。また、さらなる形態においては、本発明は、セリパンクリンの不適正な活性および濃度水準と関連している疾患の検出用の診断アッセイに関する。

【0005】

（発明の説明）

第1の形態において、本発明は、セリパンクリン・ポリペプチドに関する。かかるポリペプチドには、

- （a） 配列番号：1から選択される配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチド；
- （b） 配列番号：2から選択されるポリペプチド配列に対して、少なくとも、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；
- （c） 配列番号：2から選択されるポリペプチド配列を含んでなる単離されたポリペプチド；
- （d） 配列番号：2からのポリペプチド配列に対して、少なくとも、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する単離されたポリペプチド；
- （e） 配列番号：2から選択されるポリペプチド配列；および
- （f） 配列番号：2から選択されるポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列を有する、あるいは含んでなる単離されたポリペプチド；
- （g） （a）～（f）に記載する、かかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体が含まれる。

【0006】

本発明のポリペプチドは、セリンプロテアーゼ・ファミリーのポリペプチドの一員であると考えられる。正常な条件下における細胞増殖および組織増殖は、厳格に調節されたプロセスである。細胞外および細胞内の信号伝達経路の複雑なシステムが、増殖中の細胞が周囲組織中へと浸潤しないように保証している。この制御の妨害が、悪性腫瘍であることの証明である。それは、その致死率の主な要因となっている、悪性腫瘍の転移特性への寄与である (Stetler - Stevenson, W. G. et al., *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993, 9:541~73; Meyer, T. and Hart, I. R., *Eur. J. Cancer*, 1998: 34(2):214~21)。

【0007】

転移は、腫瘍細胞の数多くの異常な機能が関与する多段階のプロセスである。これらには、腫瘍の血管形成、付着、血管基底膜への固着、局所的なタンパク質分解、細胞外マトリックス成分の崩壊、管脈構造を通過した遊走、基底膜への侵襲、ならびに二次部位における増殖が含まれる (Poste, G. and Fidler, I. J., *Nature*, 1980: 283:139~146; Liotta, L. A. et al., *Cell*, 1991: 64(2):327~336)。増大したタンパク質分解活性は、転移した細胞の証明となる特徴の1つである。この増大した活性は、ガン細胞ならびに周囲の間質における、細胞外タンパク質分解酵素複数の協力した正常を逸脱した調節に起因すると考えられている (Chen, W. T., *Curr. Opin. Cell Biol.* 1992: 4(5):802~809)。

【0008】

腫瘍細胞は、細胞 - 細胞外マトリックスの境界では、その侵入点において増大したタンパク質分解活性を示し、従って、転移性細胞に周囲マトリックスの消化を可能とする、「浸潤突起 (invadopodia)」と呼ばれる膜突出部を作る (Chen, W. T., *Enzyme Protein*, 1996: 49:59~71)。かかる膜結合型プロテアーゼ活性のこれまでに最も良く判っている例は、おそらくは、腫瘍細胞遊走のいくつかの例における、ウロキナーゼ

・プラスミノーゲン活性化因子とマトリックス・メタロプロテイナーゼとの関与である (DeClerk, Y. A. and Laug, W. E., *Enzyme Protein*, 1996: 49: 72~84)。興味深いことに、これらのタンパク質は、増殖中の腫瘍に養分を供給するために、血管の出芽を促進させることも示されている (Kroon, M. E. et al., *Am. J. Pathol.* 1999: 154(6): 1731~42; Rabhani, S. A., *In Vivo*, 1998: 12(1): 135~42)。したがって、動物モデルにおいて、これらのタンパク質分解機構の妨害は、転移した腫瘍を治療するための有効な方法であることが既に示されている (Wilson, C. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997: 94: 1402~1407)。

【0009】

新規な細胞外セリンプロテアーゼ (Rawlings, N. D. and Barrett, A. J.; *Methods Enzymol.* 1994: 244: 19~61 中で総説されている)、すなわち、結腸ガン、卵巣ガン、膵臓ガン、前立腺ガンおよび子宮ガン (これらに限定されない) などの特定の腫瘍、あるいは、これらの腫瘍細胞の極く近傍の間質細胞において、特異的に過剰発現している、セリパンクリンの同定が、本明細書中に開示される。このプロテアーゼは、細胞骨格の細胞内成分、および/または細胞内の信号伝達もしくは分解経路と相互に作用し得る、短い細胞質内N末端を具えた、典型的なII型膜貫通ドメインタンパク質である。N末端と接して、膜貫通ドメインがあり、その直後に、低密度リポタンパク質 (LDL) ドメイン、スカベンジャー受容体システインリッチ (SRCR) ドメインおよびプロテアーゼ・ドメインが続いており、その配列相同性に基づき、これは、このタンパク質を、トリプシン様セリンプロテアーゼの類の新しいメンバーと同定される。このドメイン構造は、セリパンクリンと、これまでの最も近いそのホモログ、最近クローン化されたII型膜貫通固定型セリンプロテアーゼ TMPRSS2との間で、共通している (Paoloni-Giacobino, A. et al., *Genomics*, 1997: 44(3): 309~320)。低密度リポタンパク質受容体における

7個のタンデム反復モジュールとして最初に同定されている (Sudhof, T. C. 他、Science、1985:228:815~822)、該LDLDメインは、カルシウム結合ドメインを含有することが知られており、そして、リポタンパク質への結合を媒介する (Deborah, F. et al., Nature, 1997:388:691~693; Russell, D. W. Q. et al., J. Biol. Chem. 1989:264:21688~21782)。同様に、I型マクロファージ・スカベンジャー受容体の分析の過程で最初に同定された (Freeman, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990:87:8810~8814)、該SRCRドメインは、タンパク質-タンパク質相互作用およびリガンド結合を媒介していると考えられる (Hohenester, E. et al., Nat. Struct. Biol. 1999:6(3):228~232)。

【0010】

セリパンクリンのこのモジュール構造は、それが、そのLDLDメインおよびSRCRドメインが、セリパンクリンの分子内ならびに分子間の相互作用の特異性を決定する上で役立っている、膜貫通型セリンプロテアーゼであることを示唆している。未だ示されてはいないが、セリパンクリンは、タンパク質分解的に活性となるためには、(恐らくは、タンパク質分解機構によって) 先ず活性化を受けなければならない、不活性な形態で発現されるかもしれない。しかし、該プロテアーゼ不活性な形態自体でも、何らかの酵素活性をも欠いている、所謂アダプター・タンパク質と同様に、重要なタンパク質-タンパク質相互作用を既に発揮し得ることもまた考えられる。この可能性は、タンパク質分解ドメイン(ならびにSRCRドメイン)を欠失している、異型のスプライシングされたイソ型の発現が、セリパンクリンについて検出され得るという事実によって、裏付けられる。さらに、セリパンクリンの切断は、セリパンクリン発現細胞から離れて機能し得る、分泌型形態をもたらし得る。これらの2つの既に記載したイソ型以外に、これは、基本的には、主要なスプライシング・イソ型(アミノ酸1~432)に、C末端に付加された、明確な配列相同性を有していない60アミノ酸のさらな

る延長部がプラスされたORFを表している、第3のスプライシング・イソ型が検出される。

【0011】

クローニングの出発点は、膵臓腫瘍において過剰発現している、短鎖のcDNAの同定であった(U54603; Gress, T.M. et al., Genes Chromosomes Cancer, 1997: 19(2): 97~103)。著者らは、この転写物に対して、何らの相同性を明らかにしていなかった。(標準的な分子的で生化学的な方法を使用した、)この配列の伸長は、本発明者らがセリパンクリンと称する、この遺伝子の末端削除されたイソ型ならびに、その完全長型形態の同定につながった。対応する健康な組織においては、その発現は検出できないほど低いものの、この遺伝子は、様々なガンにおいては、特異的にアップレギュレーションされているようであるという事実は、セリパンクリンは、ガン性組織に対する良好なマーカーに相当するだけでなく、原発性ならびに二次腫瘍の特異的な治療するための、新規な薬剤の標的の役を果たし得ることをも意味している。セリパンクリンをコードする遺伝子は、細胞増殖ならびに転移の促進遺伝子を含むことが知られている遺伝子座である、染色体の11q22-q23に割り当てられている。興味深いことに、マトリックス・メタロプロテイナーゼのクラスター(MMP-1、MMP-3およびMMP-10が含まれる; Formstone, C.J. et al., Genomics, 1993: 16: 289~291)も、またその領域にマッピングされており、このことは、遺伝子座と上位相互作用との間に相関がある場合には、セリパンクリンは、これらのMMPのいずれかを活性化しているか、あるいはそれらによって、活性化されているかを示唆する可能性がある(類似のことが、プロMMP-1およびプロMMP-3の活性化に関係している、セリンプロテアーゼのプラスミンならびにトリプシンに関して、示されている(Rao, C.N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999: 255(1): 94~98 およびそれに記載の参考文献))。

【0012】

セリパンクリンの生物学的性質は、これ以降、「セリパンクリンの生物学的活性」または「セリパンクリン活性」と称する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、少なくとも、セリパンクリンの生物学的活性の1つを示す。

【0013】

本発明のポリペプチドは、また、すべての対立遺伝子形態およびスプライス変異体を含む、上記ポリペプチドの変異体をも包含する。かかるポリペプチドは、基準となるポリペプチドから、挿入、欠失、ならびに、保存的または非保存的の何れでもよい置換、あるいは、それらの任意の組み合わせによって、変異している。特に好ましい変異体は、その中のいくつかの、例えば、50個～30個、30個～20個、20個～10個、10個～5個、5個～3個、3個～2個、2個～1個、または1個のアミノ酸が、任意の組み合わせで、挿入、置換、または欠失されているものである。

【0014】

本発明のポリペプチドの好ましいフラグメントは、配列番号：2のアミノ酸配列からの、少なくとも、30個、50個または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド、あるいは配列番号：2のアミノ酸配列から、少なくとも30個、50個または100個の連続したアミノ酸が末端から削除、または欠失されているアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドを含む。好ましいフラグメントは、セリパンクリンの生物学的活性を誘起する、生物学的に活性なフラグメントであり、類似する活性または改善された活性を具えるか、あるいは望ましくない活性は低下しているフラグメントが含まれる。また、動物、特に、ヒトにおいて、抗原性または免疫原性である、そのフラグメントも好ましい。

【0015】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、対応する完全長型ポリペプチドをペプチド合成によって製造するために用いることができ；従って、これらの変異体は、本発明の完全長型ポリペプチドを製造するための中間体として用いることができる。本発明のポリペプチドは、「成熟型」タンパク質の形態であってもよく、あるいは、前駆体または融合タンパク質等の、より大きなタンパク質の一部で

あってもよい。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、精製を助ける配列、例えば、多重したヒスチジン残基、あるいは組換え生産時における安定性のための配列を含む、付加的なアミノ酸配列を含むことが、しばしば、有益である。

【0016】

本発明のポリペプチドは、任意の好適な手法、例えば、天然に存在する提供源、発現システム（下記参照）を含んでなる遺伝子操作された宿主細胞からの単離、または、例えば、自動化されたペプチド合成機を使用した化学合成、あるいは、かかる方法の組み合わせによって、調製することができる。かかるポリペプチドを調製するための手段は、当該技術分野において、十分に理解されている。

【0017】

さらなる形態において、本発明は、セリパンクリン・ポリヌクレオチドに関する。かかるポリヌクレオチドは、

(a) 配列番号：1から選択されるポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1から選択されるポリヌクレオチドを含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：1から選択されるポリヌクレオチドに対して、が少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する単離されたポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：1から選択される単離されたポリヌクレオチド；

(e) 配列番号：2から選択されるポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(f) 配列番号：2から選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(g) 配列番号：2から選択されるポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配

列をコードするポリヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：2から選択されるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド；

(i) 配列番号：1から選択されるポリヌクレオチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を有する、あるいは含んでなる単離されたポリヌクレオチド；

(j) 配列番号：2から選択されるポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有する、あるいは含んでなる単離されたポリヌクレオチド；ならびに

上述のポリヌクレオチドのフラグメントまたは変異体である、あるいは、全長にわたって、上述のポリヌクレオチドに対してその相補的であるポリヌクレオチド

を包含している。

【0018】

本発明のポリヌクレオチドの好ましいフラグメントは、配列番号：1の配列からの、少なくとも、連続した、15、30、50または100塩基を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、あるいは配列番号：1から選択される配列から、少なくとも、連続した、30、50または100塩基が末端から削除、または欠失がなされている配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドを含み。

【0019】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体は、スプライス変異体、対立遺伝子変異体、ならびに、1つまたは複数の単一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型体を、包含する。

【0020】

本発明のポリヌクレオチドは、また、配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなり、かつその中の、いくつかの、例えば、50個～30個、30個～20個、20個～10個、10個～5個、5個～3個、3個～2個、2個～1個、または1

個のアミノ酸残基が、任意の組み合わせで、置換、欠失または付加されている、ポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドをも含む。

【0021】

さらなる形態において、本発明は、本発明のDNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。従って、下記：

(a) 配列番号：2から選択されるポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含んでなる；

(b) 配列番号：2から選択されるポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物である；

(c) 配列番号：1から選択されるDNA配列のRNA転写物を含んでなる；あるいは、

(d) 配列番号：1から選択されるDNA配列のRNA転写物である；

のいずれかのRNAポリヌクレオチド

およびそれらに対して相補的であるRNAポリヌクレオチド

が提供されている。

【0022】

配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、E13203 (JP 1997 149790-A)、U75329 (Genomics, 1997: 44:309~320)との相同性を示す。配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、配列番号：2のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号：1の該ポリペプチドをコードする配列と同一であってもよく、あるいは、遺伝子コードの重複性(縮重性)の結果として、同じく配列番号：2のポリペプチドをコードする、配列番号：1以外の配列であってもよい。配列番号：2のポリペプチドは、pTMPRSS2 (Genomics, 1997: 44:309~320)との相同性および/または構造的類似性を有する、セリンプロテアーゼ・ファミリーの他のタンパク質と関連している。

【0023】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、なかでも、それら

の相同的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似する生物学的な機能/性質を有することが期待される。さらには、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも、セリパンクリン活性の1つを有する。

【0024】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト結腸、結腸腫瘍、膵臓、膵臓腫瘍、卵巣ガン、前立腺ガン、咽頭ガン、腺ガン、頬ガン、扁平上皮ガン、B細胞リンパ腫、子宮ガン、精巣、胎児肺および胚性組織の細胞中の、mRNAに由来するcDNAライブラリーから、標準的なクローニング技術およびスクリーニング技術を用いて、取得することができる。(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)を参照のこと)。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリーなどの天然の起源から取得することもでき、あるいは、周知で市販されている技術を用いて、合成することもできる。

【0025】

本発明のポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドの組換え製造のために利用する際には、該ポリヌクレオチドは、成熟型ポリペプチドのコード配列、それ自体、あるいはリーダー配列もしくは分泌配列、プレ-またはもしくはプレプロ-タンパク質の配列、あるいは、他の融合ペプチド部分をコードするものなど、他のコード配列を、その読み枠内に具えている成熟型ポリペプチド用のコード配列を含むことができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列も、コードされていることができる。本発明のこの形態のいくつかの好ましい実施態様において、マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)中に提供され、また、Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86:821~824に記載されている、ヘキサ・ヒスチジン・ペプチド、あるいはHAタグである。該ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳配列、スプライシングならびにポリアダニレーション・シグナル、リボソーム結合部位、およびmRNAを安定化

させる配列などの、非コードの、5' - および3' - 配列をも、含有してもよい。

【0026】

配列番号：1から選択されるポリヌクレオチド配列に対して、同一であるか、または十分な同一性を有するポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーション・プローブ、あるいは核酸増幅反応（例えば、PCR）用のプライマーとして、使用することができる。かかるプローブおよびプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする完全長型cDNAおよびゲノムクローンを単離するために、ならびに、配列番号：1に対して、高い配列類似性、典型的には、少なくとも95%の同一性を有する、他の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローン（ヒト起源からのパラログ、ならびにヒト以外の種に由来するオルソログおよびパラログをコードする遺伝子を含む）を単離するために、使用することができる。好ましいプローブおよびプライマーは、一般に、少なくとも15塩基、好ましくは、少なくとも30塩基を含んでなり、そして、少なくとも100塩基までとはいかなくても、少なくとも50塩基を有してもよい。特に好ましいプローブは、30～50の間の塩基長を有する。特に好ましいプライマーは、20～25の間の塩基長を有する。

【0027】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（ヒト以外の種に由来するホモログを含む）は、配列番号：1から選択される配列またはその断片、好ましくは少なくとも15塩基を有する標識されたプローブを用いて厳格なハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングする工程；および前記ポリヌクレオチド配列を含有する完全長型cDNAおよびゲノムクローンを単離する工程を含んでなる方法によって得ることができる。かかるハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知である。好ましい厳格なハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性、剪断されたサケ精子DNAを含んでなる溶液中で、42℃、一晩のインキュベ

ーション、その後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 中において約65%でのフィルターの洗浄が含まれる。したがって、本発明にはまた、配列番号：1から選択される配列またはその断片、好ましくは少なくとも15塩基を有する標識されたプローブを用いて厳格なハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングすることによって取得される、単離されたポリヌクレオチド、好ましくは少なくとも100塩基のヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドも含まれる。

【0028】

当業者は、多くの場合、ポリペプチドをコードする領域が、その5'末端まで完全には伸長していない点で、単離されたcDNA配列が不完全であることを理解している。これは、第1鎖cDNA合成に際して、mRNAテンプレートのDNAコピーを完成させることができない、逆転写酵素、すなわち、本来の低い「プロセッシング能」（ポリメラーゼーション反応の際に酵素がテンプレートへの結合を維持する能力の指標）を有する酵素の結果である。

【0029】

完全長型cDNAを取得する、あるいは短いcDNAを伸長させるために利用することができ、かつ当業者に周知の方法はいくつかあり、例えば、cDNA端の迅速な増幅（RACE）方法に基づく方法がある（例えば、Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998~9002, 1988を参照のこと）。例えば、Marathon（商標）の手法（Clontech Laboratories Inc.）によって例示される、該技術の最近の改良は、より長いcDNAの探索を著しく簡単としている。Marathon（商標）の手法では、選択した組織から抽出されたmRNA、および両端にそれぞれ連結された「アダプター」配列とから、cDNAが調製される。次いで、核酸増幅（PCR）が、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプライマーおよびアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを利用して、cDNAの「失われている」5'端を増幅するために行われる。その後、「入れこ型（ネスティッド）」プライマー、すなわち、増幅産物の内部にアニーリングするように設計されたプライマー（典型的には、アダプター配列中において、さらに3'側にアニーリングするアダプター特異的な

プライマー、および既知の遺伝子配列中において、さらに5'側にアニーリングする遺伝子特異的なプライマー)を使用して、PCR反応を繰り返す。そして、この反応の生成物は、DNA配列決定によって分析でき、また、完全な配列を与えるように、該生成物を既存のcDNAに直接結合させること、あるいは、5'プライマーの設計のために、新しい配列情報を利用して、別途に完全長のPCRを行うことのいずれかによって、完全長型のcDNAを構築できる。

【0030】

本発明の組換えポリペプチドは、発現システムを含んでなる、遺伝子操作された宿主細胞から、かかる分野で周知の方法によって調製することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含んでなる発現システム、かかる発現システムで遺伝子操作されている宿主細胞、ならびに、組換え技術による本発明のポリペプチドの製造に関する。無細胞翻訳システムもまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して、かかるタンパク質を製造するために用いることができる。

【0031】

組換え生産のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドに対する発現システムまたはその一部を取り込むように遺伝子操作を施すことができる。ポリヌクレオチドは、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986)やSambrook et al. (上述)等の、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている方法によって、宿主細胞中に導入することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入する好ましい方法には、例えば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレイプ負荷、バリスティック導入または感染が含まれる。

【0032】

適切な宿主の代表的な例には、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、大腸菌、ストレプトミセス属および枯草菌の細胞などの細菌細胞；酵母細胞お

よびアスペルギルス属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2細胞および *Spodoptera Sf9* 細胞などの昆虫細胞；CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK 293細胞およびBowesメラノーマ細胞などの動物細胞；ならびに植物細胞が含まれる。

【0033】

非常に多様な発現システム、例えば、染色体、エピソームおよびウイルスに由来するシステム、例えば、細菌プラスミド由来の、バクテリオファージ由来の、トランスポゾン由来の、酵母エピソーム由来の、挿入エレメント由来の、酵母染色体エレメント由来の、バキュロウイルス、パポバウイルス (SV40など)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス由来のベクター類、ならびに、プラスミドとバクテリオファージの遺伝子エレメントとに由来するベクター (コスミドおよびファージミドなど) 等のそれらの組合せから誘導されたベクターを、使用することができる。該発現システムは、発現を生じさせるだけでなく、調節する制御領域を含有することができる。一般に、宿主中でポリペプチドを生産するための、ポリヌクレオチドを維持、増殖、または発現させることができるシステムまたはベクターはいずれも、使用することができる。適当なポリヌクレオチド配列を、例えば、Sambrook et al. (上述) に示されている方法などの、様々な周知、慣用の技術のいずれかによって、発現システム中に挿入することができる。適合する分泌シグナルを、小胞体の内腔、周辺腔または細胞外環境への翻訳タンパク質の分泌を可能にするために、所望するポリヌクレオチドに組み込むことができる。これらのシグナルは、該ポリペプチドに対して内因性であっても、あるいは異種のシグナルであってもよい。

【0034】

本発明のポリペプチドを、スクリーニング・アッセイにおいて使用するために、発現させる際には、該ポリペプチドは、細胞の表面で産生されることが、一般に好ましい。この場合、細胞を、スクリーニング・アッセイにおける使用の先立ち、集菌することができる。該ポリペプチドが培地に分泌される場合には、ポリ

ペプチドの回収および精製を行うための、培地を回収することができる。細胞内で産生される際には、ポリペプチドを回収する前に、細胞を予め溶解しなければならない。

【0035】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、アニオン交換クロマトグラフィまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティー・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィおよびレクチン・クロマトグラフィを含む周知の方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、ハイ・パフォーマンス液体クロマトグラフィを精製のために使用する。該ポリペプチドが、細胞内合成、単離および/または精製の際に変性される場合には、活性な立体配座を再生させるために、タンパク質リフォールディング用の周知の方法を用いることができる。

【0036】

本発明のポリヌクレオチドは、関連する遺伝子中の変異の検出による、診断試薬として使用することができる。機能不全に関連している、配列番号：1のポリヌクレオチドによって特定される遺伝子の変異した形態を、cDNA配列またはゲノム配列における検出は、その遺伝子の、少なすぎる発現、過剰発現あるいは空間的または時間的に変質された発現に起因する疾患、または疾患に対する感受性の診断に付加、または限定を行うことを可能とする診断ツールを提供する。遺伝子に変異を有する個体は、当該分野で周知である様々な手法によって、DNAレベルで検出することもできる。

【0037】

診断用の核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検体または剖検体等から採取することができる。ゲノムDNAは、検出のために直接使用することができ、あるいは分析に先立ち、PCR、好ましくはRT-PCR、あるいは、他の増幅技術を使用して、酵素的に増幅することもできる。RNAまたはcDNAもまた、同様な方法で利用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズにおける変化によって検出することがで

きる。ポイント・ミューテーションは、増幅されたDNAを、標識されたセリパンクリンのヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションさせることによって同定することができる。完全に一致する配列は、RNase消化、あるいは融解温度における差によって、ミスマッチのある二重鎖と弁別することができる。DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下における、ゲル中のDNAフラグメントの電気泳動移動度の変異、あるいは直接的なDNA配列決定（例えば、Myers et al., Science, (1985) 230:1242を参照のこと）によって、検出することもできる。特定の部位における配列の変化もまた、RNaseおよびS1保護等のヌクレアーゼ保護アッセイ、あるいは化学的な切断方法によって、解明することができる（Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 85:4397~4401を参照のこと）。

【0038】

セリパンクリンのポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチド・プローブのアレイを、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。かかるアレイは、好ましくは、高密度のアレイまたは格子である。アレイ技術の手法は、周知となっており、かつ、一般的な適用可能性を有しており、また、遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変動性を含む分子遺伝学における様々な問題の解明のために利用することができる（例えば、M. Chee et al., Science 274, 610~613 (1996)ならびに、その中で引用されている他の参考文献を参照のこと）。

【0039】

異常に、低下、あるいは、増大しているポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの検出もまた、本発明にかかる疾患に対する、被験体の感受性の決定、または診断のために利用することができる。低下、または増大している発現は、ポリヌクレオチドの定量用に当該分野で周知の方法のいずれか、例えば、核酸増幅（例えば、PCR、RT-PCR）、RNase保護、ノーザンブロットおよび他のハイブリダイゼーション法等を使用して、RNAのレベルで測定することがで

きる。宿主に由来するサンプル中の、本発明にかかるポリペプチド等の、タンパク質濃度を決定するために使用可能なアッセイ技術は、当業者には周知である。かかるアッセイ方法には、放射化イムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタン・プロット分析およびE L I S Aアッセイが含まれる。

【0040】

従って、別の形態において、本発明は、(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそのフラグメント、あるいは、そのRNA転写物；

(b) (a)のヌクレオチド配列に対して、相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは、配列番号：2のポリペプチドまたはその断片； あるいは

(d) 本発明のポリペプチドに対する抗体、好ましくは配列番号：2のポリペプチドに対する抗体、
のいずれかを含んでなる診断キットに関する。

【0041】

かかるキットのいずれにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な成分を構成することができると理解される。かかるキットは、疾患または疾患に対する感受性、とりわけ、本発明にかかる疾患を診断する際に、有用である。

【0042】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体局在化の研究において、有益である。該配列は、個々のヒト染色体における特定の位置に対して、特異的に標的化され、そして、ハイブリダイゼーションすることが可能である。本発明に従って、関連する配列を染色体にマッピングすることは、それらの配列を遺伝子関連疾患と相関させる上での、重要な第一ステップである。一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上における該配列の物理的な位置を、遺伝地図データと相関させることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusick, ヒトにおけるメンデル遺伝(Mendelian Inheritance in Human)中に見出される(Johns Hopkins大学

Welch Medical Libraryを通して、オンラインで利用可能)。そして、同じ染色体領域にマッピングされている、遺伝子と疾患との関係が、連関遺伝解析(物理的に隣り合う遺伝子の同時遺伝)によって同定される。ゲノム配列(遺伝子フラグメントなど)に関する正確なヒト染色体上の局在化は、放射ハイブリッド(RH)マッピングを使用して決定することができる(Walter, M., Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J. および Goodfellow, P., (1994) 全ゲノムの放射ハイブリッド・マップを構築するための方法, Nature Genetics 7, 22~28)。多数のRHパネルは、Research Genetics (Huntsville, AL, 米国)から入手可能である。例えば、GeneBridge4 RHパネル(Hum. Mol. Genet, 1996, Mar; 5(3):339~46, ヒトゲノムの放射ハイブリッド・マップ。Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillet D., Muselet D., Prud'Homme JF, Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach, J. および Goodfellow, PN)。このパネルを使用して、遺伝子の染色体位置を決定するために、RH DNA上の関心のある遺伝子から設計されたプライマーを使用して、93回のPCRが行われる。これらのDNAはそれぞれが、ハムスターのバックグラウンド(ヒト/ハムスターのハイブリッド細胞株)中に維持されたランダムなヒト・ゲノム・フラグメントを含有している。このようなPCRは、関心のある遺伝子のPCR産物の存在または非存在を示す、93個のスコアを与える。これらのスコアは、位置が既知のゲノム配列に由来するPCR産物を使用して作製されたスコアと、比較される。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu/>において、行われる。本発明の遺伝子は、ヒト染色体の11q22-q23(D11S1347-D11S939)にマッピングされる。

【0043】

本発明のポリヌクレオチド配列はまた、組織発現研究に対する有益なツールで

ある。かかる研究は、本発明のポリヌクレオチドの発現パターン決定を可能とし、それらをコードしているmRNAを検出することで、コードされたポリペプチドの組織内での発現パターンに関して、指標を与える。利用される技術は、当該分野では周知であり、cDNAマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(Schene et al., Science, 270, 467~470, 1995およびShalon et al., Genome Res., 6, 639~645, 1996)などの、格子状に配列されたクローンに対する系内ハイブリダイゼーション方法、およびPCRなどのヌクレオチド増幅方法を含む。好ましい方法は、Perkin Elmerから入手可能なTAQMAN(商標)の手法を利用する。これらの研究から得られる結果は、該生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を提供する。加えて、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の形態(例えば、ポリペプチドのコードにおける潜在的または調節的な変異における改変を有するもの)によってコードされるmRNAのそれとの比較研究は、本発明のポリペプチドの役割、または疾患におけるその不適切な発現に対する有益な見識を提供することができる。かかる不適切な発現は、時間的、空間的、あるいは、単に量的な特徴あってもよい。

【0044】

本発明のポリペプチドは、結腸、結腸腫瘍、膵臓、膵臓腫瘍、卵巣ガン、前立腺ガン、咽頭ガン、腺ガン、頬ガン、扁平上皮ガン、B細胞リンパ腫、子宮ガン、精巣、胎児肺および胚性組織において発現している。

【0045】

本発明のさらなる形態は、抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、あるいはそれらを発現している細胞は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的である、抗体を作製するための免疫原として使用することができる。「免疫特異的」という用語は、該抗体が、先行技術における他の関連するポリペプチドに対するそれらの親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して、実質的により大きな親和性を有することを意味する。

【0046】

本発明のポリペプチドに対して創製される抗体は、常用のプロトコルを使用し

て、ポリペプチドまたはエピトープを保持するフラグメント、あるいは細胞を、動物（好ましくは、非ヒト動物）に投与することによって取得することができる。モノクローナル抗体の調製には、細胞株の継代的な培養によって作製された抗体を提供する手法のどれをも使用することができる。その例には、ハイブリドーマ技術（Kohler, G. および Milstein, C., Nature (1975), 256: 495~497）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., Immunology Today (1983), 4: 73）、およびEBVハイブリドーマ技術（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77~96, Alan R. Liss, Inc., 1985）が含まれる。

【0047】

米国特許第4,946,778号に記載されているもの等の、一本鎖抗体を製造するための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を製造するために応用することができる。また、トランス・ジェニック・マウス、あるいは他の哺乳動物を含む他の生物を、ヒト化抗体を発現させるために使用することができる。

【0048】

上記の抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定するために、あるいはアフィニティー・クロマトグラフィによって該ポリペプチドを精製するために使用することができる。本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、なかでも、本発明にかかる疾患を治療するために使用することができる。

【0049】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまた、ワクチンとして使用することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、その疾患が個体において既に慢性化しているか否かに関わらず、前記動物を疾患から、保護するために、例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む、抗体および/またはT細胞免疫応答を生成する上で、適切な本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含んでなる、哺乳動物中における免疫学的応答を誘導す

るための方法に関する。哺乳動物中における免疫学的応答はまた、本発明にかかる疾患から前記動物を保護するための、抗体を生産させるため、かかる免疫学的応答を誘導するために、該ポリヌクレオチドの発現を支配し、かつ該ポリペプチドをコードしているベクターによって、本発明のポリペプチドをインビボで生み出すことを含んでなる方法によって誘導することもできる。該ベクターを投与する1つの方法は、粒子上へのコーティング物等として、所望する細胞中へのその投与を促進することによる。かかる核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾型核酸またはDNA/RNAハイブリッドを含むことができる。使用に際し、ワクチン、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン配合物（組成物）として提供される。該配合物はさらに、好適なキャリアを含むことができる。ポリペプチドは、胃で分解されることもあるため、それは、好ましくは非経口的に（例えば、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射または皮内注射）投与される。非経口投与に好適な配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および該配合物を接種者の血液と等張性とする溶質を含有してもよい、水性および非水性の無菌注射液；ならびに、懸濁剤または増粘剤を含んでもよい、水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。該配合物は、単位用量容器または多回用量容器で、例えば、密封されたアンプルおよびバイアルで提供することができ、そして使用直前に無菌の液体キャリアを添加しさえすればよい、凍結乾燥状態で保存することができる。ワクチン配合物はまた、当該分野で公知の水中油型システムや他のシステムなどの、配合物の免疫原性を増強するためのアジュバントシステムを含むことができる。その投薬量は、ワクチンの比活性に依存し、また、慣用的な実験によって容易に決定することができる。

【0050】

本発明のポリペプチドは、1つまたは複数の疾患状態、特に、本明細書中既に記載した本発明にかかる疾患と関連している、1つまたは複数の生物学的機能を有する。したがって、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定することは有用である。したがって、さらなる形態において、本発明は、該ポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害するものを同定するために、化合物をスクリーニングする方法を提供する。かかる方法は、本明細書

中既に記載した通り、かかる本発明の疾患に対する治療ならびに予防の目的に使用することができる、アゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は、様々な起源、例えば、細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリー、化学化合物のコレクション、および天然産物混合物から、見出すことができる。そのようにして同定された、かかるアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によっては、該ポリペプチドの、天然または修飾された基質、リガンド、受容体、酵素など；その構造的または機能的な模倣体 (Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1(2):5章(1991)を参照のこと) あるいは小分子であってもよい。

【0051】

該スクリーニング方法では、該ポリペプチド、あるいはポリペプチドまたはその融合タンパク質を含んでいる細胞または膜に対する、候補化合物の結合を、候補化合物に直接的または間接的に連結されている標識によって、単に測定してもよい。あるいは、スクリーニング方法は、標識された競合剤 (例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト) に対抗した、候補化合物のポリペプチドに対する競合的な結合の (定性的または定量的な) 測定または検出を含んでもよい。さらに、これらのスクリーニング方法では、ポリペプチドを含有している細胞に適合する検出システムを使用して、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって引き起こされるシグナルをもたらすか否かを調べることもできる。活性化の阻害剤は、一般には、既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして候補化合物の存在に因る、アゴニストに依る活性化に対する作用を観測する。さらに、スクリーニング方法は、混合体を形成するため、候補化合物を、本発明のポリペプチドを含有する溶液に混合する工程、該混合物中におけるセリパンクリン活性を測定する工程、ならびに該混合物のセリパンクリン活性を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較する工程を単に含むだけでもよい。

【0052】

本発明のポリペプチドは、従来の低い容量のスクリーニング方法、そしてまた、ハイ・スループットなスクリーニング (HTS) 型において、用いることができる。かかる HTS 型は、96 -、ならびに、ほんの最近では、384 - ウエル

・マイクロタイター・プレートの広く慣用的な使用だけでなく、Schullick et al., Anal. Biochem., 246, 20~29 (1997)によって記載されているナノウエル法等の開発途中の方法をも含んでいる。

【0053】

既に記載したように、Fc部分とセリパンクリン・ポリペプチドから作製されるもの等の、融合タンパク質もまた、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための、ハイ・スループットなスクリーニング・アッセイのために使用することができる(D. Bennett et al., J. Mol. Recognition, 8:52~58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem., 270(16):9459~9471 (1995)を参照のこと)。

【0054】

スクリーニング手法

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ならびに本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、細胞内におけるmRNAおよびポリペプチドの産生に対する、添加された化合物の影響検出用のスクリーニング方法を形成するために使用することができる。例えば、当該分野で既知の常法によって、モノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体を使用して、ポリペプチドの分泌レベルまたは細胞に付随したレベルの測定用の、ELISAアッセイを構築することができる。これは、適当な操作を施された細胞または組織からのポリペプチドの産生を、阻害あるいは増強できる薬剤(それぞれ、アンタゴニストあるいはアゴニストとも呼ばれる)を発見するために使用することができる。

【0055】

本発明のポリペプチドは、場合によっては、当該分野で既知である慣用の受容体結合手法を通して、膜結合型または可溶性の受容体を同定するために使用することができる。これらには、それらには限られないが、ポリペプチドを、放射性同位体(例えば、 ^{125}I)で標識、化学修飾(例えば、ビオチン化)、あるいは検出または精製に好適なペプチド配列と融合して、そして、推定される受容体の

供給源（細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液）とともにインキュベーションする、リガンド結合アッセイおよびクロスリンク・アッセイが含まれる。他の方法には、表面プラズモン共鳴および分光測定法などの生物物理学的手法が含まれる。これらのスクリーニング方法はまた、場合によっては、ポリペプチドのその受容体に対する結合と競合する、該ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために使用することができる。かかるアッセイを行うための標準的な方法は、当該分野ではよく判っている。

【0056】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体、あるいは、ある場合には、場合によっては、ポリペプチド自体の、リガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、例えば、リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメント；あるいは、本発明のポリペプチドに結合するものの、応答を誘発せず、その結果、ポリペプチドの活性が妨げられる、小さな分子が含まれる。

【0057】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術とセリパンクリン遺伝子の使用を伴うこともできる。トランスジェニック動物を構築する手法は十分に確立されている。例えば、受精した卵母細胞の雌性前核へのマイクロ・インジェクション、移植前または移植後の胚へのレトロウイルスによる移入、あるいは、エレクトロポレーションなどによって遺伝子操作された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入を介して、セリパンクリン遺伝子を導入することができる。特に有用なトランスジェニック動物は、その動物のゲノム内において、動物の遺伝子をヒトの等価体によって置き換えられている、所謂「ノックイン」動物である。ノックイン・トランスジェニック動物は、医薬探索のプロセスにおいて、化合物はヒトの標的に対して特異的であるという、標的の妥当性検証用に有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、内因性DNA配列によってコードされている、本発明のポリペプチドに対する動物オルソログの発現が細胞内で部分的または完全に無効とされている、所謂「ノックアウト」動物である。遺伝子のノックアウトは、技術の限界の結果として、特異的な細胞または組織を対象とする、特定の細

胞または組織においてのみ起きててもよく、あるいは、動物内の全て、または実質的に全ての細胞において生じてもよい。トランスジェニック動物の手法はまた、導入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に供するために発現させられる動物全体の発現 - クローニング・システムを提供する。

【0058】

上に記載された方法において使用されるスクリーニング・キットは、本発明のさらなる形態をなす。かかるスクリーニング・キットは、

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；

を含んでなり、好ましくは、前記のポリペプチドは、配列番号：2から選択される。

【0059】

かかるキット中において、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な成分を構成することは理解される。

【0060】

(用語集)

下記の定義は、本明細書中で既に頻繁に使用されているいくつかの用語の理解を容易にするために提供される。

【0061】

本明細書中に記載されている「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、ならびにヒト化抗体、同様に、Fabフラグメントをも包含し、Fabまたは他の免疫グロブリンの発現ライブラリー生成物をも包含する。

【0062】

「単離(された)」は、その天然の状態から、「ヒトの手によって」変化していることを意味し、すなわち、自然界に存在する場合、その本来の環境から変化、または移動されているか、あるいは、その両方であることを意味する。例えば

、生きた生物に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離」されてはいないが、その天然状態の共存物質から分離された、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、この用語の本明細書中で用法に従うと、「単離」されている。さらに、形質転換、遺伝子操作、または何らかの他の組換え方法によって、生物中に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その生物が生存または非生存かのいずれでも、前記生物中に未だ存在している場合でさえ、「単離」されている。

【0063】

「ポリヌクレオチド」は、一般には、非改変型または改変型のRNAあるいはDNAであってもよい、任意のポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)を指す。「ポリヌクレオチド」には、限定ではないものの、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖、または、より典型的には、二本鎖の、あるいは、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であってもよい、DNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子が含まれる。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、あるいはRNAとDNAとの両方を含んでなる三重鎖領域をもいう。用語「ポリヌクレオチド」はまた、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。「修飾(された)」塩基には、例えば、トリチル化された塩基、ならびに、イノシンなどの非通常型の塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに対して行うことができ、従って、「ポリヌクレオチド」は、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態と同様に、自然界に典型的に見出されるような、ポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態をも包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと称される、比較的短いポリヌクレオチドをも包含する。

【0064】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合(すなわち、ペプチド等配電子体)によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含んで

なるポリペプチドのいずれをも指す。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと広く呼ばれる短い鎖、ならびに、一般にはタンパク質と呼ばれる、より長い鎖の双方ともをいう。ポリペプチドは、遺伝子によってコードされる20種のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することができる。「ポリペプチド」には、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、あるいは当該分野で周知の化学的な修飾方法のいずれかによって、修飾がなされたアミノ酸配列が含まれる。かかる修飾は、基本的な教本、およびより詳細な専門書、ならびに数多くの研究文献中に、広く記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポリペプチド内のいずれの位置に生じさせることもできる。同じタイプの修飾が、所与ポリペプチド内のいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在してもよいことが理解される。また、所与のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝がなされてもよく、また、分枝を有する、または有していない、環状であってもよい。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、翻訳に続く天然のプロセスに起因しても、あるいは合成的方法によって作製されてもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ビオチン化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、クロス・リンク形成、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPI・アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質への転移RNA媒介付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins - Structures and Molecular Properties、第2版、T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., 翻訳後のタンパク質修飾: 全体像および展望、1~12、Post-translational

Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson 編, Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., 「タンパク質修飾および非タンパク質補助因子の分析」、Meth. Enzymol., 182, 626~646, 1990; Rattan 他、「タンパク質合成：翻訳後修飾およびエージング」、Ann. NY Acad. Sci., 663, 48~62, 1992を参照のこと)。

【0065】

ポリペプチド配列の「フラグメント」は、基準となる配列よりも短いものの、基準となるポリペプチドと同一の生物学的な機能または活性を本質的に保持しているポリペプチド配列をいう。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号：1の基準となる配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

【0066】

「変異体」は、基準となるポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるものの、その本質的な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、基準となるポリヌクレオチドに対して、ヌクレオチド配列に相違がある。変異体のヌクレオチド配列における変異は、基準となるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させても、させなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、下記に説明するように、基準の配列によってコードされるポリペプチド中における、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端の短縮化を引き起こしてもよい。ポリペプチドの典型的な変異体は、基準となるポリペプチドに対して、アミノ酸配列に相違がある。一般に、改変は、基準となるポリペプチドおよび変異体の配列が全体的には非常に類似し、そして多くの領域において同一となるように制限される。変異体ならびに基準となるポリペプチドは、アミノ酸配列において、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組合せによって相違してもよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸残基であっても、なくてもよい。典型的な、保存的置換には、Gly、Ala； Val、Ile、Leu； Asp、Glu； Asn、Gln； Ser、Thr；

Lys、Arg； ならびにPheおよびTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子などの天然に存在するものであってもよく、あるいは天然では存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然でに存在しない変異体は、変異誘発方法によって、あるいは直接合成によって作製することもできる。また、1つまたは複数の翻訳後の修飾、例えば、グリコシル化、リン酸化、メチル化、ADPリボシル化などを有するポリペプチドも、また変異体には含まれる。実施態様には、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化、ならびにC末端グリシンの修飾が含まれる。

【0067】

「対立遺伝子」は、ゲノム中の所与の遺伝子座に存在する遺伝子の、2つまたはそれ以上の選択的な形態の1つをいう。

【0068】

「多型」は、集団内における、ゲノムにおける所与の位置における塩基配列（仮に関連する場合には、コードされるポリペプチド配列）の変動をいう。

【0069】

「単一塩基多型」(SNP)は、集団内においてゲノム内の1つの塩基位置における、塩基変動の発生をいう。SNPは、遺伝子内で、あるいはゲノムの遺伝子間領域内で起こってもよい。SNPは、対立遺伝子特異的増幅(ASA)を使用してアッセイすることができる。このプロセスには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーが、アッセイされる多型に対して、逆方向に相補となるように使用される。この共通プライマーは、多型な塩基から50bpから1500bpの間で隔たったものとできる。それ以外の2つ（またはそれ以上）のプライマーは、最後の3'塩基が、多型を構成する2つ（またはそれ以上）の対立遺伝子の1つと一致するように変化している点を除いて、互いに同一である。そして、それぞれ、共通プライマーおよび1つの対立遺伝子特異的プライマーを使用して、2つ（またはそれ以上）のPCR反応を、サンプルDNAについて行う。

【0070】

本明細書中で使用されている「スプライス変異体」は、同じゲノムDNA配列から一旦転写され、ただし、択一的なRNAスプライシングを受けている、RNA分子から作製されたcDNA分子をいう。択一的なRNAスプライシングは、一般には、イントロンを除くために、一次RNA転写物がスプライシングを受ける際に生じ、それぞれ、異なるアミノ酸配列をコードしてもよい、1つ以上のmRNA分子の産生が引き起こす。スプライス変異体の用語はまた、上記のcDNA分子によってコードされるタンパク質をもいう。

【0071】

「同一性」は、その配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の間における相互関係を反映している。一般に、同一性は、対比がなされている配列の長さにならって、2つのポリヌクレオチド配列、あるいは2つのポリペプチド配列の、それぞれ塩基毎またはアミノ酸毎の厳密な一致をいう。

【0072】

「%同一性」 - 正確な一致が存在しない配列については、「%同一性」を決定することができる。一般に、対比すべき2つの配列を、配列間で最大の相関を与えるようにアラインメントされる。これには、アラインメントの程度を高めるために、「ギャップ」をいずれか一方の配列または両方の配列に挿入することを含んでもよい。%同一性は、比較されている配列のそれぞれの全長にならって、決定してもよく（所謂、全体的なアラインメント）、同じ長さまたは非常に類似する長さの配列に対してに特に適している；あるいは、より短い、限定された長さにならって、決定してもよく（所謂、局所的なアラインメント）、不ぞろいな長さの配列において、より好適である。

【0073】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列の間における関係に対する、より精巧な、さらなる尺度である。一般に、「類似性」は、残基毎に基づき、（同一性に関してと、同様に）比較されている配列それぞれからの、相互に対をなす残基間における正確な一致だけでなく、正確な一致が存在しない場合にも、進化的な基準に基づいて、1つの残基は、他方に対する適当な置換であるかどうかをも考慮

する、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸間での比較を意味する。この蓋然性は、付随した「スコア」を有し、2つの配列の「%類似性」は、それに基づき決定することができる。

【0074】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法は、当該分野では周知となっている。従って、例えば、ウイスコンシン配列分析パッケージバージョン9.1 (Devereux J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12, 387~395, 1984; Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin, 米国) 中の利用可能なプログラム、例えば、BESTFIT およびGAPプログラムが、2つのポリヌクレオチド間の%同一性、ならびに2つのポリペプチド配列間の%同一性および%類似性を決定するために利用できる。BESTFITは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム (*J. Mol. Biol.*, 147, 195~197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482~489, 1981) を使用して、2つの配列間における、類似性の最も良い1つの領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の比較に対してより適しており、該プログラムは、より短い配列は、より長いものの一部を表すことを仮定している。一方、GAPは、NeddlemanおよびWunschのアルゴリズム (*J. Mol. Biol.*, 48, 443~453, 1970) に従って、「最大の類似性」を見出しつつ、2つの配列をアラインメントする。GAPは、ほぼ同じの長さであり、また、アラインメントが長さ全体にわたって期待される配列の比較に対してより適している。好ましくは、各プログラムにおいて使用される「ギャップ加重」および「長さ加重」のパラメーターは、それぞれ、ポリヌクレオチド配列に対しては、50および3であり、ポリペプチド配列に対しては、12および4である。好ましくは、比較されている2つの配列が最適にアラインメントされている際に、%同一性および類似性を決定する。

【0075】

配列間の同一性および/または類似性を決定するための他のプログラムもまた、当該分野では知られており、例えば、BLASTファミリーのプログラム(Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403~410, 1990; Altschul S.F. et al., Nucleic Acids Res., 25:389~3402, 1997; National Center for Biotechnology Information(NCBI)(Bethesda, Maryland, 米国)から入手することができ、またwww.ncbi.nlm.nih.govのNCBIのホームページからアクセス可能である)、およびFASTA(Pearson WR, Methods in Enzymology, 183, 63~99, 1990; Pearson W.R. およびLipman D.J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 2444~2448, 1988; ウィスコンシン配列分析パッケージの一部として入手可能である)。

【0076】

好ましくは、BLOSUM62 アミノ酸置換行列(Henikoff S およびHenikoff JG, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 10915~10919, 1992)を、比較の前に、ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に予め翻訳する場合をも含み、ポリペプチド配列の比較において使用する。

【0077】

好ましくは、プログラム BESTFITが、基準とするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して、検討するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用され、検討と基準とする配列とは、最適にアラインメントされ、また、プログラムのパラメーターは、前に記載したような、暫定の値に設定されている。

【0078】

「同一性指標」は、候補配列(ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)と基準の配列とを比較するために使用することができる、配列関連性の尺度である。す

なわち、例えば、基準とするポリヌクレオチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指標を有する候補ポリヌクレオチド配列は、該候補ポリヌクレオチド配列は、基準の配列の各100塩基あたり平均して5個までの相違を含んでもよい点を除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つの塩基欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリヌクレオチド配列の5'または3'末端部位に、あるいはこれら末端部位の間の任意な位置で、基準配列内の塩基間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中で点在して、起こってもよい。換言すると、基準となるポリヌクレオチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内の塩基100個毎に、平均して5個までが、任意の組合せで、欠失、置換または挿入されていてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0079】

同様に、ポリペプチドの場合には、基準のポリペプチド配列と比較したときに、例えば、0.95の同一性指標を有する候補ポリペプチド配列は、基準の配列の各100アミノ酸あたり、平均して5個までの違いを該ポリペプチド配列が含んでもよいことを除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、保存的ならびに非保存的な置換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシ末端部位に、あるいはこれら末端部位間の任意の位置に、基準の配列内のアミノ酸間に個々に、あるいは基準の配列内において1つまたは複数の群中に点在して、起こってもよい。換言すると、基準のポリペプチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリペプチド配列を得るためには、既に記載したように、基準の配列内のアミノ酸の100個毎に、平均して5個まで、任意の組合せで、欠失、置換または挿入がなされてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0080】

塩基またはアミノ酸の相違数と同一性指標との関係は、下記の式で表記でき、

$$n_a = x_a - (x_a \cdot I)$$

式中、

n_a は、塩基またはアミノ酸の相違数であり、

x_a は、配列番号：1または配列番号：2における塩基またはアミノ酸のそれぞれの総数であり、

I は、同一性指標であり、

\cdot は、乗算演算子に対する記号であり、

その際、 x_a と I との非整数の積は、 x_a から減ずるに先立ち、最も近い整数に切り捨てられる。

【0081】

「ホモログ」は、基準の配列に対して、高度の配列関連性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を示すために、当該分野で使用されている一般的な用語である。かかる関連性は、既に定義されているように、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって定量化することもできる。この総称的な用語には、「オルソログ」および「パラログ」の用語が含まれる。「オルソログ」は、別の種中における、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価体であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、機能的に類似している、同じ種内にあるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0082】

「融合タンパク質」は、2つの、関連しない、融合された遺伝子またはそのフラグメントによってコードされるタンパク質をいう。その例が、米国特許第5541087号、同第5726044号に開示されている。Fc-セリパンクリンの場合、融合タンパク質の一部として、免疫グロブリンのFc領域の使用は、治療に使用する際のかかる融合タンパク質の薬物動態学的性質を改善するため、ならびに、二量体型のセリパンクリンを形成させるために、Fc-セリパンクリンまたはセリパンクリン部の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-セリパン

クリンのDNA構築物は、5'から3'の方向に、分泌カセット、すなわち、哺乳動物細胞からの細胞外への輸送を誘起するシグナル配列、融合パートナーとして、免疫グロブリンのFc領域フラグメントをコードするDNA、およびセリパンクリンまたはその断片をコードするDNAを含んでなる。ある用途では、融合タンパク質の残部には手を触れることなく、機能的なFc側を変異させ、その固有的な機能的性質（補体結合、Fc受容体結合）を変える、あるいは発現後にFc部分を完全に除くことを可能とすることが望ましい。

【0083】

特許および特許出願に限らず、これらを含む、本明細書中で引用されている刊行物および参考文献の全ては、十分に述べているように、個々の刊行物または参考文献を、参照して、本明細書中に組み込むために、明示的かつ個別的に示唆されているように、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。本出願が優先権を主張する特許出願はいずれも、先に刊行物および参考文献に関して記載したと同様に、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。

【0084】

（さらなる事例）

実施例1

バキュロウイルス転移ベクターの構築および発現

主要なスプライシング・イソ型の、アミノ酸残基52~435をコードするDNAフラグメントを、バキュロウイルスの発現システムにおけるセリパンクリンの発現のために、クローン化した。発現には、StratageneのベクターpPbac(Stratagene)を使用した。このシステムは、ヒト胎盤アルカリホスファターゼ・タンパク質のシグナルペプチド配列を、発現すべき配列の前方に融合されている、分泌型融合タンパク質の発現を可能とする。該セリパンクリン遺伝子は、5'のSmaI制限部位および3'のBamHI部位を介して、このベクター中のフレーム内に導入した。主要なスプライシング・イソ型の上記領域を増幅するために、5'プライマー：5' AACCCGGGAAGGTGATTCTGGATAAATACTAC3' および3'プライマー：5'

AAGGATCCTTACAGCTCAGCCTTCCAGACATTG3' を使用して、1回のPCR反応を行った。正しいオープンリーディング・フレームが保持されていることを確認するために、挿入部全体、挿入接合部、およびベクターにより提供されているシグナルペプチド配列を、配列決定した。Sf9細胞中での融合タンパク質発現は、ポリヘドロン遺伝子座からの発現に基づくバキュロウイルスシステムに対する、慣用の実験室的手法を使用して行った。

【0085】

セリパンクリン配列の付加的な変異には、場合により、より容易なタンパク質発現の検出、精製および濃縮用に、3'末端(C端)におけるMRGS(H)。タグの挿入が含まれた。

【0086】

実施例2

セリパンクリンの製造

セリパンクリンを含む培養上清を、バキュロ発現システムから採取し、加圧透析によって濃縮した。EMD-DEAE-Fractogelなどの弱アニオン交換樹脂は、該タンパク質の最初の吸着には理想的であることが判明した。セリパンクリンの脱離は、塩化ナトリウムの直線的な勾配(0~0.8M NaCl、Tris、pH7.5)を使用して行った。さらなる精製は、主として、この最初のクロマトグラフィ・工程で達成される純度に依存した。必要に応じて、イオン交換樹脂支持体上において、付加的な再クロマトグラフィを行った。精製の最終工程は、Superdex 75 カラムを使用して行った。溶出サンプルを集め、そして、Centricon 10 遠心器(Amicon)によってPBS中でさらに濃縮した。その後、これらの調製物を、分析ならびに機能的試験を実施するために、使用した。タンパク質の分析グレードの精製(タンパク質の配列決定に先立ち必要である)には、逆相RP18カラムを使用した。

【0087】

クロマトグラフィ条件の最適化を、Pharmaciaから入手可能な、分析カラムを備えたBiacoreクロマトグラフィ・システムを使用して行った。

B i a C o r eに基づく分離プロトコルは、F P L C技術を使用することによってスケール・アップされた。該最適化された溶出条件は、半生産用または生産用のスケールでの分離に、直接、変換することができる。最後のクロマトグラフィ工程から回収されたサンプルを集め、S D S - P A G Eによって分析した。タンパク質のバンドは、クーマシー染色を使用して可視化した。還元条件下では、精製された組換えタンパク質は、47962の計算された理論的な分子量と比較して、55 k D a \pm 2 k D aの相対的な分子量を示した。

【0088】

I E F - P A G E (I m m o b i l i n e 3 ~ 1 0、P h a r m a c i a)法を使用する等電点フォーカシングは、p H 5 . 7 \pm 0 . 5の等電点を示した。タンパク質バンドおよびI E F マーカーは、クーマシー染色を使用して可視化された。

【0089】

場合により、組換えセリパンクリン・タンパク質のC端ヒスチジン・タグ化体を発現させた。発現したタンパク質は、抗M R G S (H) 6抗体を使用するウエスタン・プロット法によって検出された。精製は、カラム・マトリックス上に固定化され、かつC o、N iまたはC uなどの金属イオンで修飾されたN T Aまたはイミド酢酸などのキレーターを使用して行った。

【0090】

実施例3

免疫化および抗体

利用可能な、精製された組換えタンパク質を用いて、動物の免疫化を直ちに開始した。免疫血清をウサギにおいて惹起させ、そして、高力価の試薬が、さらなるスクリーニングのために入手可能であった。

【0091】

さらなる抗血清は、完全なタンパク質の配列に基づく合成ペプチドを使用して、生成された。合成ペプチドを合成し(アミノ酸配列 15 ~ 28、83 ~ 96、166 ~ 180、246 ~ 262、382 ~ 395)、K L Hに結合して、ウサギを免疫化するために使用した。組換えタンパク質または合成ペプチドを用い

て作成された高力価の免疫血清を、組換えタンパク質をモニターならびに定量するための、確立されたE l i s a法およびウエスタン・プロット法に使用した。一般には、所与の特異性の抗体をプールして、硫酸アンモニウムで沈澱させ、P B Sに対して透析した。選択された血清を、P i e r c eから入手可能な、ビオチンのN H Sエステル誘導体を使用してビオチン化した。ビオチン化は、製造者の説明書に従って行った。ポリクローナル抗体の惹起および特定のために使用される、抗原および免疫化学的手法は、モノクローナル抗体の特異的な生産のために使用されるプロトコルと容易に組み合わせることができる。この分野の専門家は、ハイブリドーマに基づく手法などの古典的な手法から抗体ライブラリーに基づく方法の間で、その特定の実行可能性に従って、選択を行うことができる。

【0092】

実施例4

セリパンクリンを評価用の免疫アッセイ

組換えセリパンクリンを用いて惹起させた特異的な血清を、96ウエル・マイクロ・タイター・プレート(N u n c)をコーティングするための「キャッチャー抗体」として使用した。50 μ lの抗セリパンクリン血清(20 μ g/ml)を使用して、プレートを一晩コーティングした。使用する前に、該プレートをP B Sで3回洗浄し、そして、非特異的な接着を防止するためにB S A溶液(1%)で1時間インキュベーションした。ブロッキング溶液の残余を除き、連続希釈された、50 μ lのセリパンクリンを加えて、1時間インキュベーションした。検出のためにビオチン化抗セリパンクリン抗体の塗布に先立ち、プレートを3回洗浄した。さらなる1時間後、読み取りは、490nmで測定される、O D B 錠剤(D a k o)などの基質を用いた、ストレプトアビジン - P O Dの触媒的な発色反応によって行った。

【0093】

実施例5

プロテアーゼ活性のアッセイ

セリパンクリンのプロテアーゼ活性を決定するために、組換え分泌型タンパク質を、主要なスプライシング・イソ型のアミノ酸52~435を発現するバキュ

ロウイルス発現システムの上清から精製した。ユニバーサル・プロテアーゼ基質（カゼイン、レソルフィン標識、BOEHRINGER MANNHEIM）を含有する緩衝化溶液に、製造者のプロトコルに従って、精製されたタンパク質を加えた。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Seripancrin

<130> SeripancrinUHWS

<140>

10 <141>

<160>.6

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 1305

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1305)

25 <400> 1

atg gat cct gac agt gat caa cct ctg aac agc ctc gat gtc aaa ccc 48
Met Asp Pro Asp Ser Asp Gln Pro Leu Asn Ser Leu Asp Val Lys Pro
1 5 10 15

30 ctg cgc aaa ccc cgt atc ccc atg gag acc ttc aga aag gtg ggg atc 96
Leu Arg Lys Pro Arg Ile Pro Met Glu Thr Phe Arg Lys Val Gly Ile
20 25 30

ccc atc atc ata gca cta ctg agc ctg gcg agt atc atc att gtg gtt 144
35 Pro Ile Ile Ile Ala Leu Leu Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ile Val Val
35 40 45

gtc ctc atc aag gtg att ctg gat aaa tac tac ttc ctc tgc ggg cag 192
40 Val Leu Ile Lys Val Ile Leu Asp Lys Tyr Tyr Phe Leu Cys Gly Gln
50 55 60

cct ctc cac ttc atc ccg agg aag cag ctg tgt gac gga gag ctg gac 240
45 Pro Leu His Phe Ile Pro Arg Lys Gln Leu Cys Asp Gly Glu Leu Asp
65 70 75 80

tgt ccc ttg ggg gag gac gag gag cac tgt gtc aag agc ttc ccc gaa 288
50 Cys Pro Leu Gly Glu Asp Glu Glu His Cys Val Lys Ser Phe Pro Glu
85 90 95

ggg cct gca gtg gca gtc cgc ctc tcc aag gac cga tcc aca ctg cag 336
55 Gly Pro Ala Val Ala Val Arg Leu Ser Lys Asp Arg Ser Thr Leu Gln
100 105 110

gtg ctg gac tcg gcc aca ggg aac tgg ttc tct gcc tgt ttc gac aac 384
60 Val Leu Asp Ser Ala Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala Cys Phe Asp Asn
115 120 125

ttc aca gaa gct ctc gct gag aca gcc tgt agg cag atg ggc tac agc 432
Phe Thr Glu Ala Leu Ala Glu Thr Ala Cys Arg Gln Met Gly Tyr Ser
130 135 140


```

    agt ggt ggg ccc ctg atg tac caa tct gac cag tgg cat gtg gtg ggc      1200
    Ser Gly Gly Pro Leu Met Tyr Gln Ser Asp Gln Trp His Val Val Gly
    385                      390                      395                      400

5   atc gtt acc tgg ggc tat ggc tgc ggg ggc ccg agc acc cca gga gta      1248
    Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Gly Pro Ser Thr Pro Gly Val
                                405                                410                                415

    tac acc aag gtc tca gcc tat ctc aac tgg atc tac aat gtc tgg aag      1296
10  Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu Asn Trp Ile Tyr Asn Val Trp Lys
                                420                                425                                430

    gct gag ctg                                                                1305
15  Ala Glu Leu
                                435

    <210> 2
    <211> 435
20  <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 2
25  Met Asp Pro Asp Ser Asp Gln Pro Leu Asn Ser Leu Asp Val Lys Pro
    1                      5                      10                      15

    Leu Arg Lys Pro Arg Ile Pro Met Glu Thr Phe Arg Lys Val Gly Ile
                                20                                25                                30

30  Pro Ile Ile Ile Ala Leu Leu Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ile Val Val
    35                      40                      45

    Val Leu Ile Lys Val Ile Leu Asp Lys Tyr Tyr Phe Leu Cys Gly Gln
    50                      55                      60

35  Pro Leu His Phe Ile Pro Arg Lys Gln Leu Cys Asp Gly Glu Leu Asp
    65                      70                      75                      80

    Cys Pro Leu Gly Glu Asp Glu Glu His Cys Val Lys Ser Phe Pro Glu
40  85                      90                      95

    Gly Pro Ala Val Ala Val Arg Leu Ser Lys Asp Arg Ser Thr Leu Gln
                                100                                105                                110

45  Val Leu Asp Ser Ala Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala Cys Phe Asp Asn
    115                      120                                125

    Phe Thr Glu Ala Leu Ala Glu Thr Ala Cys Arg Gln Met Gly Tyr Ser
50  130                      135                                140

    Ser Lys Pro Thr Phe Arg Ala Val Glu Ile Gly Pro Asp Gln Asp Leu
    145                      150                                155                                160

    Asp Val Val Glu Ile Thr Glu Asn Ser Gln Glu Leu Arg Met Arg Asn
55  165                      170                                175

    Ser Ser Gly Pro Cys Leu Ser Gly Ser Leu Val Ser Leu His Cys Leu
                                180                                185                                190

60  Ala Cys Gly Lys Ser Leu Lys Thr Pro Arg Val Val Gly Gly Glu Glu
    195                      200                                205

```

Ala Ser Val Asp Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Tyr Asp Lys
210 215 220

5 Gln His Val Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asp Pro His Trp Val Leu Thr
225 230 235 240

Ala Ala His Cys Phe Arg Lys His Thr Asp Val Phe Asn Trp Lys Val
245 250 255

10 Arg Ala Gly Ser Asp Lys Leu Gly Ser Phe Pro Ser Leu Ala Val Ala
260 265 270

Lys Ile Ile Ile Ile Glu Phe Asn Pro Met Tyr Pro Lys Asp Asn Asp
15 275 280 285

Ile Ala Leu Met Lys Leu Gln Phe Pro Leu Thr Phe Ser Gly Thr Val
290 295 300

20 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Phe Phe Asp Glu Glu Leu Thr Pro Ala Thr
305 310 315 320

Pro Leu Trp Ile Ile Gly Trp Gly Phe Thr Lys Gln Asn Gly Gly Lys
325 330 335

25 Met Ser Asp Ile Leu Leu Gln Ala Ser Val Gln Val Ile Asp Ser Thr
340 345 350

Arg Cys Asn Ala Asp Asp Ala Tyr Gln Gly Glu Val Thr Glu Lys Met
30 355 360 365

Met Cys Ala Gly Ile Pro Glu Gly Gly Val Asp Thr Cys Gln Gly Asp
370 375 380

35 Ser Gly Gly Pro Leu Met Tyr Gln Ser Asp Gln Trp His Val Val Gly
385 390 395 400

Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Gly Pro Ser Thr Pro Gly Val
405 410 415

40 Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu Asn Trp Ile Tyr Asn Val Trp Lys
420 425 430

Ala Glu Leu
45 435

<210> 3
50 <211> 1479
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
55 <221> CDS
<222> (1)..(1479)

<400> 3
atg gat cct gac agt gat caa cct ctg aac agc ctc gat gtc aaa ccc 48
60 Met Asp Pro Asp Ser Asp Gln Pro Leu Asn Ser Leu Asp Val Lys Pro
1 5 10 15

	ctg cgc aaa ccc cgt atc ccc atg gag acc ttc aga aag gtg ggg atc	96
	Leu Arg Lys Pro Arg Ile Pro Met Glu Thr Phe Arg Lys Val Gly Ile	
	20 25 30	
5	ccc atc atc ata gca cta ctg agc ctg gcg agt atc atc att gtg gtt	144
	Pro Ile Ile Ile Ala Leu Leu Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ile Val Val	
	35 40 45	
10	gtc ctc atc aag gtg att ctg gat aaa tac tac ttc ctc tgc ggg cag	192
	Val Leu Ile Lys Val Ile Leu Asp Lys Tyr Tyr Phe Leu Cys Gly Gln	
	50 55 60	
15	cct ctc cac ttc atc ccg agg aag cag ctg tgt gac gga gag ctg gac	240
	Pro Leu His Phe Ile Pro Arg Lys Gln Leu Cys Asp Gly Glu Leu Asp	
	65 70 75 80	
20	tgt ccc ttg ggg gag gac gag gag cac tgt gtc aag agc ttc ccc gaa	288
	Cys Pro Leu Gly Glu Asp Glu Glu His Cys Val Lys Ser Phe Pro Glu	
	85 90 95	
25	ggg cct gca gtg gca gtc cgc ctc tcc aag gac cga tcc aca ctg cag	336
	Gly Pro Ala Val Ala Val Arg Leu Ser Lys Asp Arg Ser Thr Leu Gln	
	100 105 110	
30	gtg ctg gac tgg gcc aca ggg aac tgg ttc tct gcc tgt ttc gac aac	384
	Val Leu Asp Ser Ala Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala Cys Phe Asp Asn	
	115 120 125	
35	ttc aca gaa gct ctc gct gag aca gcc tgt agg cag atg gcc tac agc	432
	Phe Thr Glu Ala Leu Ala Glu Thr Ala Cys Arg Gln Met Gly Tyr Ser	
	130 135 140	
40	agc aaa ccc act ttc aga gct gtg gag att gcc cca gac cag gat ctg	480
	Ser Lys Pro Thr Phe Arg Ala Val Glu Ile Gly Pro Asp Gln Asp Leu	
	145 150 155 160	
45	gat gtt gtt gaa atc aca gaa aac agc cag gag ctt cgc atg cgg aac	528
	Asp Val Val Glu Ile Thr Glu Asn Ser Gln Glu Leu Arg Met Arg Asn	
	165 170 175	
50	tca agt ggg ccc tgt ctc tca ggc tcc ctg gtc tcc ctg cac tgt ctt	576
	Ser Ser Gly Pro Cys Leu Ser Gly Ser Leu Val Ser Leu His Cys Leu	
	180 185 190	
55	gcc tgt ggg aag agc ctg aag acc ccc cgt gtg gtg ggt ggg gag gag	624
	Ala Cys Gly Lys Ser Leu Lys Thr Pro Arg Val Val Gly Gly Glu Glu	
	195 200 205	
60	gcc tct gtg gat tct tgg cct tgg cag gtc agc atc cag tac gac aaa	672
	Ala Ser Val Asp Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Tyr Asp Lys	
	210 215 220	
65	cag cac gtc tgt gga ggg agc atc ctg gac ccc cac tgg gtc ctc acg	720
	Gln His Val Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asp Pro His Trp Val Leu Thr	
	225 230 235 240	
70	gca gcc cac tgc ttc agg aaa cat acc gat gtg ttc aac tgg aag gtg	768
	Ala Ala His Cys Phe Arg Lys His Thr Asp Val Phe Asn Trp Lys Val	
	245 250 255	

	cgg gca ggc tca gac aaa ctg ggc agc ttc cca tcc ctg gct gtg gcc	816
	Arg Ala Gly Ser Asp Lys Leu Gly Ser Phe Pro Ser Leu Ala Val Ala	
	260 265 270	
5	aag atc atc atc att gaa ttc aac ccc atg tac ccc aaa gac aac gac	864
	Lys Ile Ile Ile Ile Glu Phe Asn Pro Met Tyr Pro Lys Asp Asn Asp	
	275 280 285	
10	atc gcc ctc atg aag ctg cag ttc cca ctc act ttc tca ggc aca gtc	912
	Ile Ala Leu Met Lys Leu Gln Phe Pro Leu Thr Phe Ser Gly Thr Val	
	290 295 300	
15	agg ccc atc tgt ctg ccc ttc ttc gat gag gag ctc act cca gcc acc	960
	Arg Pro Ile Cys Leu Pro Phe Phe Asp Glu Glu Leu Thr Pro Ala Thr	
	305 310 315 320	
20	cca ctc tgg atc att gga tgg ggc ttt acg aag cag aat gga ggg aag	1008
	Pro Leu Trp Ile Ile Gly Trp Gly Phe Thr Lys Gln Asn Gly Gly Lys	
	325 330 335	
25	atg tat gac ata ctg ctg cag gcg tca gtc cag gtc att gac agc aca	1056
	Met Ser Asp Ile Leu Leu Gln Ala Ser Val Gln Val Ile Asp Ser Thr	
	340 345 350	
30	cgg tgc aat gca gac gat ggc tac cag ggg gaa gtc acc gag aag atg	1104
	Arg Cys Asn Ala Asp Asp Ala Tyr Gln Gly Glu Val Thr Glu Lys Met	
	355 360 365	
35	atg tgt gca ggc atc ccg gaa ggg ggt gtg gac acc tgc cag ggt gac	1152
	Met Cys Ala Gly Ile Pro Glu Gly Gly Val Asp Thr Cys Gln Gly Asp	
	370 375 380	
40	agt ggt ggg ccc ctg atg tac caa tct gac cag tgg cat gtg gtg ggc	1200
	Ser Gly Gly Pro Leu Met Tyr Gln Ser Asp Gln Trp His Val Val Gly	
	385 390 395 400	
45	atc gtt agc tgg ggc tat ggc tgc ggg ggc ccg agc acc cca gga gta	1248
	Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Gly Pro Ser Thr Pro Gly Val	
	405 410 415	
50	tac acc aag gtc tca gcc tat ctc aac tgg atc tac aat gtc tgg aag	1296
	Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu Asn Trp Ile Tyr Asn Val Trp Lys	
	420 425 430	
55	gat aga act att caq aga agc tgt aac tcc cca ggg aca ggt ctt gtg	1344
	Asp Arg Thr Ile Gln Arg Ser Cys Asn Ser Pro Gly Thr Gly Leu Val	
	435 440 445	
60	att cag caa cca gct gta ccg ctg atg gag cta cgg tca gct ccg cac	1392
	Ile Gln Gln Pro Ala Val Pro Leu Met Glu Leu Arg Ser Ala Arg His	
	450 455 460	
65	aca cat cgc ctg acc acc tgt gtt tgc ttt ctc tca ttc cct gcc tta	1440
	Thr His Arg Leu Thr Thr Cys Val Cys Phe Leu Ser Phe Pro Ala Leu	
	465 470 475 480	
70	cag ccc ctg tcc ccc tta tgc cca ttt ccc tgg gat tga	1479
	Gln Pro Leu Ser Pro Leu Cys Pro Phe Pro Trp Asp	
	485 490	

```

<210> 4
<211> 492
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 4
Met Asp Pro Asp Ser Asp Gln Pro Leu Asn Ser Leu Asp Val Lys Pro
 1          5          10          15
Leu Arg Lys Pro Arg Ile Pro Met Glu Thr Phe Arg Lys Val Gly Ile
10          20          25          30
Pro Ile Ile Ile Ala Leu Leu Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ile Val Val
 35          40          45
Val Leu Ile Lys Val Ile Leu Asp Lys Tyr Tyr Phe Leu Cys Gly Gln
 50          55          60
15 Pro Leu His Phe Ile Pro Arg Lys Gln Leu Cys Asp Gly Glu Leu Asp
 65          70          75          80
Cys Pro Leu Gly Glu Asp Glu Glu His Cys Val Lys Ser Phe Pro Glu
 85          90          95
Gly Pro Ala Val Ala Val Arg Leu Ser Lys Asp Arg Ser Thr Leu Gln
20          100         105         110
Val Leu Asp Ser Ala Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala Cys Phe Asp Asn
 115         120         125
Phe Thr Glu Ala Leu Ala Glu Thr Ala Cys Arg Gln Met Gly Tyr Ser
 130         135         140
25 Ser Lys Pro Thr Phe Arg Ala Val Glu Ile Gly Pro Asp Gln Asp Leu
 145         150         155         160
Asp Val Val Glu Ile Thr Glu Asn Ser Gln Glu Leu Arg Met Arg Asn
 165         170         175
Ser Ser Gly Pro Cys Leu Ser Gly Ser Leu Val Ser Leu His Cys Leu
30          180         185         190
Ala Cys Gly Lys Ser Leu Lys Thr Pro Arg Val Val Gly Gly Glu Glu
 195         200         205
Ala Ser Val Asp Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Ile Gln Tyr Asp Lys
 210         215         220
35 Gln His Val Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asp Pro His Trp Val Leu Thr
 225         230         235         240
Ala Ala His Cys Phe Arg Lys His Thr Asp Val Phe Asn Trp Lys Val
 245         250         255
Arg Ala Gly Ser Asp Lys Leu Gly Ser Phe Pro Ser Leu Ala Val Ala
40          260         265         270
Lys Ile Ile Ile Ile Glu Phe Asn Pro Met Tyr Pro Lys Asp Asn Asp
 275         280         285
Ile Ala Leu Met Lys Leu Gln Phe Pro Leu Thr Phe Ser Gly Thr Val
 290         295         300
45 Arg Pro Ile Cys Leu Pro Phe Phe Asp Glu Glu Leu Thr Pro Ala Thr
 305         310         315         320
Pro Leu Trp Ile Ile Gly Trp Gly Phe Thr Lys Gln Asn Gly Gly Lys
 325         330         335
Met Ser Asp Ile Leu Leu Gln Ala Ser Val Gln Val Ile Asp Ser Thr
50          340         345         350
Arg Cys Asn Ala Asp Asp Ala Tyr Gln Gly Glu Val Thr Glu Lys Met
 355         360         365
Met Cys Ala Gly Ile Pro Glu Gly Gly Val Asp Thr Cys Gln Gly Asp
 370         375         380
55 Ser Gly Gly Pro Leu Met Tyr Gln Ser Asp Gln Trp His Val Val Gly
 385         390         395         400
Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Gly Pro Ser Thr Pro Gly Val
 405         410         415
Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu Asn Trp Ile Tyr Asn Val Trp Lys
60          420         425         430
Asp Arg Thr Ile Gln Arg Ser Cys Asn Ser Pro Gly Thr Gly Leu Val

```

```

      435              440              445
Ile Gln Gln Pro Ala Val Pro Leu Met Glu Leu Arg Ser Ala Arg His
      450              455              460
Thr His Arg Leu Thr Thr Cys Val Cys Phe Leu Ser Phe Pro Ala Leu
5  465              470              475              480
Gln Pro Leu Ser Pro Leu Cys Pro Phe Pro Trp Asp
      485              490

10
<210> 5
<211> 609
<212> DNA
<213> Homo sapiens

15
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(609)

30 <400> 5
atg gat cct gac agt gat caa cct ctg aac agc ctc gat gtc aaa ccc 48
Met Asp Pro Asp Ser Asp Gln Pro Leu Asn Ser Leu Asp Val Lys Pro
      1              5              10              15

25 ctg cgc aaa ccc cgt atc ccc atg gag acc ttc aga aag gtg ggg atc 96
Leu Arg Lys Pro Arg Ile Pro Met Glu Thr Phe Arg Lys Val Gly Ile
      20              25              30

30 ccc atc atc ata gca cta ctg agc ctg gcg agt atc atc att gtg gtt 144
Pro Ile Ile Ile Ala Leu Leu Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ile Val Val
      35              40              45

35 gtc ctc atc aag gtg att ctg gat aaa tac tac ttc ctc tgc ggg cag 192
Val Leu Ile Lys Val Ile Leu Asp Lys Tyr Tyr Phe Leu Cys Gly Gln
      50              55              60

40 cct ctc cac ttc atc ccg agg aag cag ctg tgt gac gga gag ctg gac 240
Pro Leu His Phe Ile Pro Arg Lys Gln Leu Cys Asp Gly Glu Leu Asp
      65              70              75              80

45 tgt ccc tgg ggg gag gac gag gag cac tgt gtc aag agc ttc ccc gaa 288
Cys Pro Leu Gly Glu Asp Glu Glu His Cys Val Lys Ser Phe Pro Glu
      85              90              95

45 ggg cct gca gtg gca gtc cgc ctc tcc aag gac cga tcc aca ctg cag 336
Gly Pro Ala Val Ala Val Arg Leu Ser Lys Asp Arg Ser Thr Leu Gln
      100              105              110

50 gtg ctg gac tgg gcc aca ggg aac tgg ttc tct gcc tgt ttc gac aac 384
Val Leu Asp Ser Ala Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala Cys Phe Asp Asn
      115              120              125

55 ttc aca gca gcc cta gct cgg cca cac ttg gtg ctc cca gca tcc cag 432
Phe Thr Ala Ala Leu Ala Arg Pro His Leu Val Leu Pro Ala Ser Gln
      130              135              140

60 gga gag aca cag ccc act gaa caa ggt ctc agg ggt att gct aag cca 480
Gly Glu Thr Gln Pro Thr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ile Ala Lys Pro
      145              150              155              160

aga agg aac ttt ccc aca cta ctg aat gga agc agg ctg tct tgt aaa 528

```

```

Arg Arg Asn Phe Pro Thr Leu Leu Asn Gly Ser Arg Leu Ser Cys Lys
      165                      170                      175

5  agc cca gat cac tgt ggg ctg gag agg aga agg aaa ggg tcc gcg cca 576
   Ser Pro Asp His Cys Gly Leu Glu Arg Arg Arg Lys Gly Ser Ala Pro
      180                      185                      190

   gcc ctg tcc gtc ttc acc cat ccc caa gcc tac 609
   Ala Leu Ser Val Phe Thr His Pro Gln Ala Tyr
10      195                      200

<210> 6
<211> 203
15 <212> PRT
   <213> Homo sapiens

<400> 6
20 Met Asp Pro Asp Ser Asp Gln Pro Leu Asn Ser Leu Asp Val Lys Pro
   1 5 10 15

   Leu Arg Lys Pro Arg Ile Pro Met Glu Thr Phe Arg Lys Val Gly Ile
      20 25 30

25 Pro Ile Ile Ile Ala Leu Leu Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ile Val Val
      35 40 45

   Val Leu Ile Lys Val Ile Leu Asp Lys Tyr Tyr Phe Leu Cys Gly Gln
      50 55 60

30 Pro Leu His Phe Ile Pro Arg Lys Gln Leu Cys Asp Gly Glu Leu Asp
   65 70 75 80

   Cys Pro Leu Gly Glu Asp Glu Glu His Cys Val Lys Ser Phe Pro Glu
35      85 90 95

   Gly Pro Ala Val Ala Val Arg Leu Ser Lys Asp Arg Ser Thr Leu Gln
      100 105 110

40 Val Leu Asp Ser Ala Thr Gly Asn Trp Phe Ser Ala Cys Phe Asp Asn
      115 120 125

   Phe Thr Ala Ala Leu Ala Arg Pro His Leu Val Leu Pro Ala Ser Gln
45      130 135 140

   Gly Glu Thr Gln Pro Thr Glu Gln Gly Leu Arg Gly Ile Ala Lys Pro
   145 150 155 160

50 Arg Arg Asn Phe Pro Thr Leu Leu Asn Gly Ser Arg Leu Ser Cys Lys
      165 170 175

   Ser Pro Asp His Cys Gly Leu Glu Arg Arg Arg Lys Gly Ser Ala Pro
      180 185 190

55 Ala Leu Ser Val Phe Thr His Pro Gln Ala Tyr
      195 200

```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 00/06211
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/57 C12N9/64 C12N15/11 C12N15/10 C07K19/00 C07K16/40 C12Q1/37		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 CI2N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, EMBL, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAOLONI-GIACOBINO A ET AL: "CLONING OF THE TMPRSS2 GENE, WHICH ENCODES A NOVEL SERINE PROTEASE WITH TRANSMEMBRANE, LDLRA, AND SRCR DOMAINS AND MAPS TO 21Q22.3" GENOMICS,US,ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, vol. 44, no. 3, 15 September 1997 (1997-09-15), pages 309-320, XP000856785 ISSN: 0888-7543 cited in the application the whole document	1-11
A	JP 09 149790 A (SUNTORY LTD) 10 June 1997 (1997-06-10) the whole document	1-11
--- --- --- --- ---		
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 February 2001		22/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentzen 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, D

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/06211

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 99 36550 A (INCYTE PHARMA INC ;CORLEY NEIL C (US); YUE HENRY (US); BANDMAN OLG) 22 July 1999 (1999-07-22) abstract; claims 1-23; figures SEQ.ID6,18	1-8,10, 11
P, X	WO 00 12758 A (RECIPON HERVE ;DIADEXUS LLC (US); SALCEDA SUSANA (US); SUN YONGMIN) 9 March 2000 (2000-03-09) abstract; claims 2-13; figure SEQ.ID.2	1-8,10, 11
P, X	WO 00 12708 A (BAKER KEVIN ;GENENTECH INC (US); GODDARD AUDREY (US); GURNEY AUSTI) 9 March 2000 (2000-03-09) abstract; claims 1-27; figures 155,,SEQ.ID.274,	1-8,10

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 09149790 A	10-06-1997	NONE	
WO 9936550 A	22-07-1999	AU 2113599 A EP 1045913 A	02-08-1999 25-10-2000
WO 0012758 A	09-03-2000	NONE	
WO 0012708 A	09-03-2000	AU 5590899 A AU 6041399 A WO 0017353 A	21-03-2000 10-04-2000 30-03-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
	1/21		9/64	Z
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
	9/64		1/37	
C 1 2 Q	1/02		1/68	A
	1/37	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
(71)出願人	Frankfurter Str. 250, D - 64293 Darmstadt, Fed eral Republic of Ge rmany			
(72)発明者	センデルマン、ブリタ ドイツ連邦共和国 デー - 64285 ベイン ベルグシュトラッセ 6 アー			
(72)発明者	ホフマン、ウーヴェ ドイツ連邦共和国 デー - 64665 アルス バッハ ハーンレイナーシュトラッセ 42			
(72)発明者	マツイク、シークフリート ドイツ連邦共和国 デー - 64673 ツィン ゲンベルグ ヴェツバッハ 24			
(72)発明者	ヴィルベルト、オリヴェル ドイツ連邦共和国 デー - 64289 ダルム シュタット リエプフラウエンシュトラ ッセ 54			
F タ-ム(参考)	2G045 AA40 DA36 FB03 FB07 4B024 AA01 AA11 BA14 CA02 CA07 CA12 CA20 DA02 EA02 FA18 GA11 HA03 HA11 4B050 CC01 CC05 DD11 FF11E FF12E LL01 LL03 LL05 4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ36 QQ41 QQ53 QQ61 QQ89 QR08 QR16 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62 QR77 QR80 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02 4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 BD14 CA33 CA44 CA46 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71			

专利名称(译)	斯里潘克林		
公开(公告)号	JP2003506017A	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001509750	申请日	2000-07-04
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	センデルマンブリタ ホフマンウーヴェ マツイクシークフリート ヴィルベルトオリヴェル		
发明人	センデルマン、ブリタ ホフマン、ウーヴェ マツイク、シークフリート ヴィルベルト、オリヴェル		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/11 C12N15/57 C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33 /53		
CPC分类号	C12N9/6424 C07K2319/00		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/64.Z C12Q1/02 C12Q1/37 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024 /CA02 4B024/CA07 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/FA18 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B050/CC01 4B050/CC05 4B050/DD11 4B050/FF11E 4B050/FF12E 4B050 /LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ36 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR16 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063 /QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA33 4B065/CA44 4B065 /CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71		
优先权	1999113428 1999-07-12 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了脂联蛋白多肽及其多核苷酸，以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用脂联蛋白多肽及其多核苷酸的方法。