

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506047

(P2005-506047A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00 Z N A A

2 G O 4 5

A O 1 K 67/027

A O 1 K 67/027

4 B O 2 4

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 31/7088

4 B O 2 9

A 6 1 K 31/7105

A 6 1 K 31/7105

4 B O 3 3

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

D

4 B O 5 0

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 323 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-575309 (P2002-575309)

(86) (22) 出願日 平成14年3月27日 (2002.3.27)

(85) 翻訳文提出日 平成15年9月29日 (2003.9.29)

(86) 国際出願番号 PCT/US2002/009611

(87) 国際公開番号 W02002/077267

(87) 国際公開日 平成14年10月3日 (2002.10.3)

(31) 優先権主張番号 60/279, 228

(32) 優先日 平成13年3月27日 (2001.3.27)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/291, 501

(32) 優先日 平成13年5月15日 (2001.5.15)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503344090

デンドレオン・サンディエゴ・リミテッド
・ライアビリティ・カンパニーDENDREON SAN DIEGO
LLCアメリカ合衆国92121カリフォルニア
州サンディエゴ、サイエンス・パーク・ロ
ード3030番

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稔

(74) 代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(74) 代理人 100064610

弁理士 中嶋 正二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜貫通型セリンプロテアーゼ9をコード化する核酸分子、コード化されたポリペプチドおよびそれらに基づく方法

(57) 【要約】

I I 型膜貫通型セリンプロテアーゼ9 (M T S P 9) ポリペプチドが本明細書において提供される。チモーゲンおよびこれらのポリペプチドの活性化型ならびにプロテアーゼドメインの単鎖および2本鎖型がまた提供される。M T S P 9 のプロテアーゼ活性を調整する化合物を同定するためにポリペプチドを使用する方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I I 型膜型セリンプロテアーゼ 9 (M T S P 9) のプロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分を含む、実質的に精製された単鎖もしくは 2 本鎖ポリペプチド。

【請求項 2】

活性化された 2 本鎖タンパク質である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、

配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ~ 7 2 9 として示されるヌクレオチド配列によりコード化されるアミノ酸配列を含み、そして配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 8 5 % のアミノ酸配列同一性を含む、ポリペプチド； 10

配列番号 1 7 に示されるヌクレオチド配列によりによりコード化されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

ヌクレオチド配列であって配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ~ 7 2 9 としてもしくは配列番号 1 7 として示されるヌクレオチド配列に高度のストリンジェンシーの条件下にその全長の少なくとも 70 % に沿ってハイブリダイズするヌクレオチド配列によりによりコード化されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

アミノ酸 1 1 ~ 2 4 2 もしくは配列番号 1 8 として示されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；

配列番号 6 もしくは 1 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；および 20

配列番号 1 7 に示される配列のスプライス変異体であるヌクレオチド配列によりコード化される、ポリペプチド

からなる群から選択される、ポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって；

ポリペプチドの M T S P 9 部分が M T S P 9 のプロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分から本質的に成る、ポリペプチド。

【請求項 5】

M T S P 9 がヒトのポリペプチドである、請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。 30

【請求項 6】

M T S P 9 のプロテアーゼドメインもしくは M T S P 9 のプロテアーゼドメインの触媒的に活性な部分から本質的に成る、請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 7】

M T S P 9 のプロテアーゼドメインもしくは M T S P 9 のプロテアーゼドメインの触媒的に活性な部分から本質的に成る、請求項 3 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 6 にアミノ酸 1 1 ~ 2 4 2 として示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。 40

【請求項 9】

配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 1 0】

請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチドであって、プロテアーゼドメインが配列番号 6 のアミノ酸 1 1 ~ 2 4 2 として示されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 1 1】

請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチドであって、配列番号 6 として示されるアミノ酸配列もしくは配列番号 1 8 として示されるアミノ酸配列を含むところのポリペプチドと約 8 0 % 以上の配列同一性を有し、そこではポリペプチドがプロテアーゼである、 50

ポリペプチド。

【請求項 1 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、プロテアーゼドメイン部分が核酸分子であって配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ～ 7 2 9 としめしくは配列番号 1 7 としめ示されるヌクレオチド配列または少なくとも一つのそのドメインもしくはドメインの触媒的に活性な部分を含む核酸分子に高度のストリンジェンシーの条件下にその全長の少なくとも 70 % に沿ってハイブリダイズする核酸分子によりコード化される、ポリペプチド。

【請求項 1 3】

ドメインがプロテアーゼドメインである、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、ポリペプチドが配列番号 1 8 に示される完全な配列を含まないでそして配列番号 1 8 の少なくともアミノ酸 8 5 ～ 8 7 および／もしくは 1 6 0 ～ 1 6 5 を含む、ポリペプチド。

【請求項 1 5】

突然変異タンパク質である請求項 3 に記載のポリペプチドであって、約 5 0 % までのアミノ酸がさらに別のアミノ酸により置換され；そして得られたポリペプチドが突然変異していないポリペプチドの少なくとも 1 0 % の触媒活性を有する単鎖もしくは 2 本鎖のポリペプチドである；

ポリペプチド。

【請求項 1 6】

約 1 0 % までのアミノ酸がさらに別のアミノ酸により置換される、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 に記載のポリペプチドであって、得られたポリペプチドが単鎖もしくは 2 本鎖のポリペプチドでありそして突然変異していないタンパク質の少なくとも 5 0 % の触媒活性を有する、ポリペプチド。

【請求項 1 8】

プロテアーゼドメイン中の遊離システインがさらに別のアミノ酸により置換される、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 9】

置換するアミノ酸がセリンである、請求項 1 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

M T S P 9 のプロテアーゼドメインから本質的に成る、単離された実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項 2 1】

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の核酸分子であって、

(a) 配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ～ 7 2 9 としめしくは配列番号 1 7 としめ示されるヌクレオチドの配列；

(b) ヌクレオチド配列であって配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ～ 7 2 9 としめしくは配列番号 1 7 としめ示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約 7 0 % に沿って高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列；

(c) 配列番号 1 6 のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

(d) (a)、(b) もしくは (c) のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；

(e) 配列番号 5、1 5 もしくは 1 7 に示される配列と少なくとも約 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % または 9 5 % の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分をコード化する、ヌクレオチドの配列；および

10

20

30

40

50

(f)(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)の縮重コドンを含む、ヌクレオチドの配列：からなる群から選択されるヌクレオチドの配列を含む、核酸分子。

【請求項 23】

請求項15に記載の突然変異タンパク質をコード化する、単離された核酸分子。

【請求項 24】

請求項 21 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 25】

発現ベクターである、請求項 24 に記載のベクター。

【請求項 26】

真核性のベクターである、請求項 24 に記載のベクター。

10

【請求項 27】

請求項 24 に記載のベクターであって、それに機能するように結合されたヌクレオチド配列によりコード化される任意のポリペプチドの分泌を指示するヌクレオチドの配列を含む、ベクター。

【請求項 28】

PichiaベクターもしくはE. coliベクターである、請求項 24 に記載のベクター。

【請求項 29】

請求項 24 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 30】

原核性の細胞である、請求項 29 に記載の細胞。

20

【請求項 31】

真核性の細胞である、請求項 29 に記載の細胞。

【請求項 32】

細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞の中から選択される、請求項 29 に記載の細胞。

【請求項 33】

哺乳動物の細胞である、請求項 29 に記載の細胞。

【請求項 34】

請求項 6 に記載のポリペプチドをコード化する、核酸分子。

【請求項 35】

30

請求項 34 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 36】

請求項 35 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 37】

組み替え非ヒト動物であって、請求項 1 に記載のポリペプチドをコード化する内因性遺伝子が動物もしくはその祖先の相同性組み替えもしくは挿入突然変異誘発により欠失されるかもしくは不活性化されている、動物。

【請求項 38】

M T S P 9 ポリペプチドのプロテアーゼドメインを含む、ポリペプチドを製造する方法であって、

40

請求項 29 に記載の細胞をそれによりコード化されたポリペプチドが細胞により発現される条件下で培養すること；および

発現されたポリペプチドを回収すること；

を含む、方法。

【請求項 39】

ポリペプチドが培養培地の中に分泌される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

細胞がPichia細胞である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

ポリペプチドが宿主細胞の細胞質の中に発現される、請求項 38 に記載の方法。

50

【請求項 4 2】

ポリペプチドのプロテアーゼドメインを含むポリペプチドを製造する方法であって、請求項 3 6 に記載の細胞をそれによりコード化されたポリペプチドが細胞により発現される条件下で培養すること；および発現されたポリペプチドを回収すること；を含む、方法。

【請求項 4 3】

アンチセンス核酸分子であって、請求項 1 に記載の M T S P 9 のプロテアーゼドメインをコード化するヌクレオチドの連続的配列に相補的である少なくとも 1 4 個の連続的ヌクレオチドもしくは修飾したヌクレオチドを含むか；または請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の M T S P 9 のプロテアーゼドメインをコード化するヌクレオチドの連続的配列に相補的である少なくとも 1 6 個の連続的ヌクレオチドもしくは修飾したヌクレオチドを含むか；または請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の M T S P 9 のプロテアーゼドメインをコード化するヌクレオチドの連続的配列に相補的である少なくとも 3 0 個の連続的ヌクレオチドもしくは修飾したヌクレオチドを含み、そこではアンチセンス分子は配列番号 1 8 のヌクレオチド 1 1 6 2 ～ 1 2 6 2 を含む、アンチセンス核酸分子。

【請求項 4 4】

請求項 4 3 に記載のアンチセンス分子であって、配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ～ 7 2 9 としもしくは配列番号 1 7 とし示されるヌクレオチドの配列の相補体であるヌクレオチドの連続的配列を含む、アンチセンス分子。

【請求項 4 5】

二重鎖 RNA (d s RNA) 分子であって、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の M T S P 9 をコード化するヌクレオチドの配列から少なくとも約 2 1 個の連続的ヌクレオチドもしくは修飾したヌクレオチドを含む、二重鎖 RNA 分子。

【請求項 4 6】

抗体がポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体であってよい、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドのプロテアーゼドメイン、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントまたは誘導体の単鎖型および／もしくは 2 本鎖型に特異的に結合する抗体。

【請求項 4 7】

ポリペプチドの酵素的活性を阻害する、請求項 4 6 に記載の抗体。

【請求項 4 8】

抗体がポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体であってよくそしてそれがポリペプチドの酵素的活性を阻害する、請求項 3 に記載のポリペプチドのプロテアーゼドメイン、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントまたは誘導体の単鎖型および／もしくは 2 本鎖型に特異的に結合する抗体。

【請求項 4 9】

抗体がポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体であってよくそしてそれがポリペプチドの酵素的活性を阻害する、請求項 6 に記載のポリペプチドのプロテアーゼドメインの単鎖型および／もしくは 2 本鎖型、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントまたは誘導体に特異的に結合する抗体。

【請求項 5 0】

結合体であって、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、およびポリペプチドに直接的にもしくはリンカーを介して結合したターゲティング剤；を含む、結合体。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

請求項 5 0 に記載の結合体であって、
ターゲティング剤が、
結合体の親和性単離および精製；
結合体の表面への付着；
結合体の検出；もしくは
選択された組織もしくは細胞への目標を定めた送達、
を許容する、結合体。

【請求項 5 2】

結合体であって、
請求項 3 に記載のポリペプチド、および
ポリペプチドに直接的にもしくはリンカーを介して結合したターゲティング剤：
を含む、結合体。

10

【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の結合体であって、
ターゲティング剤が、
結合体の親和性単離および精製；
結合体の表面への付着；
結合体の検出；もしくは
選択された組織もしくは細胞へターゲティングされた送達、
を可能とする、結合体。

20

【請求項 5 4】

結合体であって、
請求項 6 に記載のポリペプチド、および
ポリペプチドに直接的にもしくはリンカーを介して結合したターゲティング剤：
を含む、結合体。

【請求項 5 5】

請求項 5 4 に記載の結合体であって、
ターゲティング剤が、
結合体の親和性単離および精製；
結合体の表面への付着；
結合体の検出；もしくは
選択された組織もしくは細胞へターゲティングされた送達、
を可能とする、結合体。

30

【請求項 5 6】

組合せであって、
請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの触媒活性を阻害する剤もしくは処
置；および
抗腫瘍性のもしくは抗血管新生性の処置または剤から選択されるさらに別な処置または剤
：
を含む、組合せ。

40

【請求項 5 7】

請求項 5 6 に記載の組合せであって、
阻害剤および抗腫瘍性のおよび／もしくは抗血管新生性の剤が単一の医薬組成物中に処方
されるか、もしくはそれぞれが別々の医薬組成物に処方される、組合せ。

【請求項 5 8】

請求項 5 6 に記載の組合せであって、
阻害剤が抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドならびに二重鎖 RNA (dsRNA)
から選択される、組合せ。

【請求項 5 9】

50

固体支持体であってそれに直接的にもしくはリンカーを介してのどちらかで結合した請求項 1 ～ 20 のいずれか 1 項に記載の二つもしくはそれ以上のポリペプチドを含む、固体支持体。

【請求項 60】

ポリペプチドがアレイを含む、請求項 59 に記載の支持体。

【請求項 61】

ポリペプチドが複数の異なるプロテアーゼドメインを含む、請求項 59 に記載の支持体。

【請求項 62】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 16 個のヌクレオチドを含有する、請求項 21 に記載の二つもしくはそれ以上の核酸分子またはそれに直接的にもしくはリンカーを介してのどちらかで結合したそのオリゴヌクレオチド部分を含む、固体支持体。 10

【請求項 63】

核酸分子がアレイを含む、請求項 62 に記載の支持体。

【請求項 64】

核酸分子が異なるプロテアーゼドメインをコード化する複数の分子を含む、請求項 62 に記載の支持体。

【請求項 65】

ポリペプチドのプロテアーゼ活性を調整する化合物を同定する方法であって、請求項 1 ～ 20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをポリペプチドによりタンパク質分解的に切断される基質と接触させること、および、同時に、前にもしくは後でのどちらかで、一つの試験化合物またはその複数を添加すること； 20
試験化合物の存在下で切断された基質の量を測定すること；ならびに
対照に比較して切断された基質の量を変化させる化合物を選択すること；
を含み、それによりポリペプチドの活性を調整する化合物を同定する、
方法。

【請求項 66】

請求項 65 に記載の方法であって、
試験化合物がポリペプチドの活性を調整するところの小分子、ペプチド、ペプチドミメティック、天然産物、抗体もしくはそれらのフラグメントである、方法。

【請求項 67】

複数の試験物質が同時にスクリーニングされる、請求項 65 に記載の方法。 30

【請求項 68】

請求項 65 に記載の方法であって、
ポリペプチドが、

(a) 配列番号 5 でヌクレオチド 31 ～ 729 としてもしくは配列番号 17 として示されるヌクレオチドの配列；

(b) ヌクレオチド配列であって配列番号 5 でヌクレオチド 31 ～ 729 としてもしくは配列番号 17 として示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約 70 % に沿って高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列； 40

(c) 配列番号 16 のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

(d) (a)、(b) もしくは (c) のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；

(e) 配列番号 5、15 もしくは 17 に示される配列と少なくとも約 80 % または 85 % の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分をコード化する、ヌクレオチドの配列；および

(f) (a)、(b)、(c)、(d) もしくは (e) の縮重コドンを含む、ヌクレオチドの配列である；

ヌクレオチドの配列からなる群から選択されるヌクレオチドの配列によりコード化されるポリペプチドから本質的に成る、方法。

【請求項 69】

請求項 6 5 に記載の方法あって、

ポリペプチドが、

配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ~ 7 2 9 として示されるヌクレオチドの配列によりコード化されるアミノ酸の配列を含む、ポリペプチド；

配列番号 1 7 で示されるヌクレオチドの配列によりコード化されるアミノ酸の配列を含む、ポリペプチド；

配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ~ 7 2 9 としてもしくは配列番号 1 7 として示されるヌクレオチドの配列に高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズするところのヌクレオチドの配列によりコード化されるアミノ酸の配列を含む、ポリペプチド；

配列番号 6 のアミノ酸 1 1 ~ 2 4 2 として示されるアミノ酸の配列を含む、ポリペプチド 10

；
配列番号 1 6 のアミノ酸 1 1 ~ 2 4 2 として示されるアミノ酸の配列もしくは配列番号 1 8 のアミノ酸配列と少なくとも約 6 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチド；および

配列番号 1 8 に示される配列のスプライス変異体であるヌクレオチドの配列によりコード化されるポリペプチド；

からなる群から選択されるポリペプチドから本質的に成る、方法。

【請求項 7 0】

請求項 6 5 に記載の方法あって、

切断された基質の量の変化が試験化合物の存在下で切断された基質の量を試験化合物の不在下で切断された基質の量と比較することにより評価される、方法。 20

【請求項 7 1】

複数のポリペプチドが直接的にもしくはリンカーを介してのどちらかで固体支持体に結合する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 2】

ポリペプチドがアレイを含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

M T S P 9 ポリペプチドの単鎖および／もしくは 2 本鎖のプロテアーゼドメインにならびに／または単鎖および／もしくは 2 本鎖のポリペプチドにならびに／またはその単鎖および／もしくは 2 本鎖型のタンパク質分解的に活性な部分に特異的に結合する化合物を同定 30

する方法であって、
請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の M T S P 9 ポリペプチドもしくはそのタンパク質分解的に活性な部分を一つの試験化合物またはその複数とその結合に伝導性 (conductive) の条件下で接触させること；および

a) 単鎖および／もしくは 2 本鎖型のポリペプチドにまたはその単鎖および／もしくは 2 本鎖型のタンパク質分解的に活性な部分に特異的に結合する試験化合物を同定することか、または

b) 単鎖および／もしくは 2 本鎖型のポリペプチドにまたはその単鎖および／もしくは 2 本鎖型のタンパク質分解的に活性な部分に結合すると知られている化合物の結合を阻害するところの試験化合物を同定することか； 40

のどちらか；

を含み、そこでは既知の化合物をポリペプチドと試験化合物の以前に、と共に同時にまたは後に接触させる、方法。

【請求項 7 4】

ポリペプチドが直接的にもしくはリンカーを介して間接的にのどちらかで固体支持体に結合する、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

請求項 7 3 に記載の方法あって、

試験化合物がその小分子、ペプチド、ペプチドミメティック、天然産物、抗体もしくはそのフラグメントである、方法。 50

【請求項 7 6】

複数の試験物質が同時にスクリーニングされる、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

複数のポリペプチドが固体支持体に結合する、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 8】

請求項 7 3 に記載の方法あって、

ポリペプチドが、

(a) 配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ～ 7 2 9 としてもしくは配列番号 1 7 として示されるヌクレオチドの配列；

(b) ヌクレオチド配列であって配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ～ 7 2 9 としてもしくは配列番号 1 7 として示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約 7 0 % に沿って高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列； 10

(c) 配列番号 1 6 のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

(d) (a)、(b) もしくは (c) のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；

(e) 配列番号 5、1 5 もしくは 1 7 に示される配列と少なくとも約 8 0 % または 8 5 % の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分をコード化する、ヌクレオチドの配列；および

(f) (a)、(b)、(c)、(d) もしくは (e) の縮重コドンを含む、ヌクレオチドの配列；

によりコード化されるポリペプチドから本質的に成る、方法。 20

【請求項 7 9】

チモーゲン型の M T S P 9 のアクチベーターを同定する方法であって、

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載のチモーゲン型の M T S P 9 ポリペプチドもしくははその潜在的にタンパク質分解的に活性な部分をポリペプチドの活性化型の基質と接触させること；

試験化合物が基質の添加の前に、後でもしくは同時に、添加されるところで、試験化合物を添加すること；および

基質の切断を検出すること；

を含み、それによりチモーゲンを活性化する化合物を同定する、方法。

【請求項 8 0】

基質が色素産生性の基質である、請求項 7 9 に記載の方法。 30

【請求項 8 1】

基質が L - ピログルタミル - L - プロリル - L - アルギニン - p - ニトロアニリン塩酸塩である、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

試験化合物が少分子、核酸もしくはポリペプチドである、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 3】

哺乳動物において、新生物形成性疾患を処置するか予防する方法であって、

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの阻害剤の有効量を哺乳動物に投与することを含む、方法。 40

【請求項 8 4】

請求項 8 3 に記載の方法あって、

阻害剤がポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントもしくは誘導体であり、そこでは抗体がポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体である、方法。

【請求項 8 5】

請求項 8 3 に記載の方法あって、

ポリペプチドが、

(a) 配列番号 5 でヌクレオチド 3 1 ～ 7 2 9 としてもしくは配列番号 1 7 として示されるヌクレオチドの配列； 50

(b)ヌクレオチド配列であって配列番号5でヌクレオチド31～729としてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約70%に沿って高度のストリンジェンシーでハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列；

(c)配列番号16のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

(d)(a)、(b)もしくは(c)のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；

(e)配列番号5、15もしくは17に示される配列と少なくとも約80%または85%の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分をコード化する、ヌクレオチドの配列；および

(f)(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)の縮重コドンを含む、ヌクレオチドの配列である；

10

ヌクレオチドの配列によりコード化されるポリペプチドから本質的に成る、方法。

【請求項86】

請求項83に記載の方法あって、

ポリペプチドが、

(a)配列番号5でヌクレオチド31～729としてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチドの配列；

(b)ヌクレオチド配列であって配列番号5でヌクレオチド31～729としてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿って高度のストリンジェンシーでハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列；

20

(c)配列番号16のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

(d)(a)、(b)もしくは(c)のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；および

(e)(a)、(b)、(c)もしくは(d)の縮重コドン；

によりコード化されるポリペプチドを含む、方法。

【請求項87】

腫瘍発生、成長もしくは進行を阻害するかまたは悪性腫瘍もしくは前がん性異常を処置する方法であって、

請求項1～20のいずれか1項に記載のチモーゲン型のMTSP9ポリペプチドもしくはその潜在的にタンパク質分解的に活性部分の活性化切断を阻害するかまたは活性化型のMTSP9もしくはそのタンパク質分解的に活性な部分の活性を阻害するところの剤を投与

30

することを含む、方法。

【請求項88】

異常が乳房、子宮頸、前立腺、肺、卵巣もしくは結腸の異常である、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

剤がアンチセンスオリゴヌクレオチド、二重鎖RNA(dsRNA)もしくは抗体である、請求項87に記載の方法。

【請求項90】

、抗腫瘍性および抗血管新生性の処置または剤から選択されるもう一つの処置または剤を投与することをさらに含む、請求項87に記載の方法。

40

【請求項91】

請求項87に記載の方法あって、

ポリペプチドが、

(a)配列番号5でヌクレオチド31～729としてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチドの配列；

(b)ヌクレオチド配列であって配列番号5でヌクレオチド31～729としてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約70%に沿って高度のストリンジェンシーでハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列；

(c)配列番号16のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

50

(d)(a)、(b)もしくは(c)のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；
 (e)配列番号5、15もしくは17に示される配列と少なくとも約80%または85%の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分をコード化する、ヌクレオチドの配列；および
 (f)(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)の縮重コドンを含む、ヌクレオチドの配列：
 によりコード化されるポリペプチドから本質的に成る、方法。

【請求項92】

請求項87に記載の方法あって、
 ポリペプチドが、

- (a)配列番号5でヌクレオチド31～729としてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチドの配列； 10
- (b)ヌクレオチド配列であって配列番号5でヌクレオチド31～729としてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿って高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列；
- (c)配列番号16のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；
- (d)(a)、(b)もしくは(c)のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；および
- (e)(a)、(b)、(c)もしくは(d)の縮重コドンである：
 ヌクレオチドの配列によりコード化されるポリペプチドを含む、方法。

【請求項93】

請求項に記載のMTSP9ポリペプチドの単鎖および／もしくは2本鎖型にならびに／または請求項1～20のいずれか1項に記載のMTSP9ポリペプチドの単鎖および／もしくは2本鎖型のタンパク質分解的に活性な部分に結合する化合物を同定する方法であって 20

、
 試験化合物を両方の型に接触させること；

化合物がどちらの型に結合するかを決定すること；ならびに

もしそれがポリペプチドの一つの型に結合するならば、化合物が以下の性質の少なくとも一つを有しているか否かをさらに決定すること；

(i)単鎖チモーゲン型のポリペプチドの活性化切断を阻害する；

(ii)二本鎖もしくは単鎖の型の活性を阻害する；および

(iii)タンパク質の二量体化を阻害する； 30

を含む、方法。

【請求項94】

新生物形成性疾患を検出する方法であって、

生物学的試料の中で請求項1～20のいずれか1項に記載のポリペプチドを含むポリペプチドを検出すること：を含み、そこでは検出される量、型および／もしくは活性が新生物形成性疾患を有しない対象から検出されるポリペプチドの量、型および／もしくは活性とは異なる、方法。

【請求項95】

請求項94に記載の方法あって、

生物学的試料が血液、尿、唾液、涙、滑液、汗、間質液、精液、脳脊髄液、腹水、腫瘍細胞生検材料、および循環腫瘍細胞からなる群から選択される、方法。 40

【請求項96】

請求項1～20のいずれか1項に記載のポリペプチドの単鎖および／もしくは2本鎖型に結合する化合物を同定する方法であって、

試験化合物を両方の型に接触させること；

化合物がどちらの型に結合するかを決定すること；ならびに

もしそれがポリペプチドの一つの型に結合するならば、化合物が以下の性質の少なくとも一つを有しているか否かをさらに決定すること；

(i)単鎖チモーゲン型のポリペプチドの活性化切断を阻害する；

(ii)二本鎖もしくは単鎖の型の活性を阻害する；および 50

(iii)タンパク質の二量体化を阻害する：

を含む、方法。

【請求項 97】

請求項 96 に記載の方法あって、

生物学的試料が血液、尿、唾液、涙、滑液、汗、間質液、精液、脳脊髄液、腹水、腫瘍細胞生検材料、および循環腫瘍細胞からなる群から選択される、方法。

【請求項 98】

両方の型がプロテアーゼドメインから本質的に成る、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 99】

対象における前がん病変、悪性病変、もしくは他の病態の存在を診断する方法であって、 10
対象から生物学的試料を採取すること；および

それを 2 本鎖および／もしくは単鎖型の M T S P 9 ポリペプチドに結合する検出可能な剤に曝露させること；

を含み、そこでは病態は 2 本鎖および／もしくは単鎖型の存在もしくは不在を特徴とする、方法。

【請求項 100】

腫瘍進行および／もしくは治療の有効性をモニターする方法であって、

身体組織または液体試料中の M T S P 9 ポリペプチドのレベル、型および／もしくは活性を検出することならびに／または定量化することを含む、方法。

【請求項 101】

腫瘍が乳房、子宮頸、前立腺、肺、卵巣もしくは結腸の腫瘍である、請求項 100 に記載の方法。 20

【請求項 102】

体液が血液、尿、汗、唾液、脳脊髄液および滑液である、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 103】

請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであって、ポリペプチドが配列番号 18 の少なくともアミノ酸 85～87 および／もしくは 160～165 を含む、ポリペプチド。

【請求項 104】

M T S P 9 ポリペプチドのプロテアーゼ活性を調整する化合物を同定する方法であって、 30
請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドもしくはそのタンパク質分解的に活性な部分をポリペプチドによりタンパク質分解的に切断された基質と接触させることおよび、一つの試験化合物もしくはその複数を添加すると同時に、前にまたは後でのどちらかで；

試験化合物の存在下に切断された基質の量を測定すること；および

対照と比較して切断された基質の量を変化させる化合物を選択すること；

を含み、それによりポリペプチドの活性を調整する化合物が同定される、方法。

【請求項 105】

請求項 104 に記載の方法あって、

ポリペプチドが、 40

(a)配列番号 5 でヌクレオチド 31～729 としもしくは配列番号 17 とし示されるヌクレオチドの配列；

(b)ヌクレオチド配列であって配列番号 5 でヌクレオチド 31～729 としもしくは配列番号 17 とし示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約 70 % に沿って高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列；

(c)配列番号 16 のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

(d)(a)、(b)もしくは(c)のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；

(e)配列番号 5、15 もしくは 17 に示される配列と少なくとも約 80 % または 85 % の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼドメインもしくはその触媒 50

的に活性な部分をコード化する、ヌクレオチドの配列；および
(f)(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)の縮重コドンを含む、ヌクレオチドの配列である：

ヌクレオチドの配列によりコード化されるポリペプチドを含む、方法。

【請求項 106】

請求項 104 に記載の方法あって、

ポリペプチドが、

(a) 配列番号 5 でヌクレオチド 31～729 としてもしくは配列番号 17 として示されるヌクレオチドの配列；

(b) ヌクレオチド配列であって配列番号 5 でヌクレオチド 31～729 としてもしくは配列番号 17 として示されるヌクレオチドの配列にその全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約 70% に沿って高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズする、ヌクレオチドの配列；

(c) 配列番号 16 のポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列；

(d)(a)、(b)もしくは(c)のスプライス変異体である、ヌクレオチドの配列；

(e) 配列番号 5、15 もしくは 17 に示される配列と少なくとも約 80% または 85% の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分をコード化する、ヌクレオチドの配列；および

(f)(a)、(b)、(c)、(d)もしくは(e)の縮重コドンを含む、ヌクレオチドである：

ヌクレオチドの配列によりコード化されるポリペプチドから本質的に成る、方法。

【請求項 107】

プロテアーゼドメインが配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 108】

請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコード化する異種の核酸を含む、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 109】

プローブもしくはプライマーであって、

請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の M T S P 9 のプロテアーゼドメインをコード化するヌクレオチドの連続的配列に同一である少なくとも 14 個の連続的ヌクレオチドもしくは修飾したヌクレオチドを含むか：または

請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の M T S P 9 のプロテアーゼドメインをコード化するヌクレオチドの連続的配列に同一である少なくとも 16 個の連続的ヌクレオチドもしくは修飾したヌクレオチドを含むか：または

請求項 1～20 のいずれか 1 項に記載の M T S P 9 のプロテアーゼドメインをコード化するヌクレオチドの連続的配列に同一である少なくとも 30 個の連続的ヌクレオチドもしくは修飾したヌクレオチドを含み、そこではアンチセンス分子は配列番号 18 のヌクレオチド 1162～1262 を含む、プローブもしくはプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願)

2001 年 3 月 27 日に出願された、米国仮出願一連番号第 60/279,228 号、Edwin L. Madison and Edgar O. Ong、題名「膜貫通型セリンプロテアーゼ 9 をコード化する核酸分子、コード化されたポリペプチドおよびそれらに基づく方法」、ならびに 2001 年 5 月 15 日に出願された、米国仮出願一連番号第 60/291,501 号、Edwin L. Madison および Edgar O. Ong、題名「膜貫通型セリンプロテアーゼ 9 をコード化する核酸分子、コード化されたポリペプチドおよびそれらに基づく方法」、に対して優先権を請求中である。許可された場合には、これらの出願のそれぞれの対象事項は全体的な出典明示により本明細書の一部とする。

【0002】

10

20

30

40

50

技術分野

プロテアーゼおよびその部分、特にプロテアーゼドメインをコード化する核酸分子が提供される。また、プロテアーゼおよびそのドメインならびにコード化する核酸分子を用いる予防の、診断のおよび治療の方法が提供される。

【0003】

背景技術および発明の目的

米国において主な死因であるがんは、増殖して腫瘍塊を形成する異常な腫瘍性細胞数の増加、これらの新生腫瘍細胞による隣接組織への浸潤、ならびに血液もしくはリンパ系を介して局所のリンパ節および遠隔部に転移する悪性細胞の生成を特徴とする。がんの特質の中には、腫瘍細胞およびそれらの環境との間のコミュニケーションの破綻がある。正常細胞は促進的シグナルの不在下では分裂しないで、阻害的シグナルの存在下では分裂を停止する。増殖促進的および増殖阻害的なシグナルは、組織内の細胞間で日常的に取り交わされている。がん性、もしくは腫瘍性の状態では、細胞はこれらのシグナルを''無視''して正常細胞が成長しない条件下で増殖する能力を獲得する。

10

【0004】

腫瘍細胞を増殖するためには、遺伝的变化を反映する多数の特有の異常な特性を獲得する。特定の良く研究された腫瘍のゲノムは、活性化発がん遺伝子および不活性化腫瘍抑制遺伝子を含む、数個の異なる独立に変化した遺伝子を保有する。これらの遺伝子変化のそれぞれが、或る特性を付与する責任があり、これらが集まって完全な腫瘍性表現型を表していると思われる。

20

【0005】

種々の生化学的因子が転移の異なる相に関連づけられてきている。コラーゲン、ラミニンのような糖タンパク質、およびプロテオグリカンに対する細胞表面受容体は、浸潤および転移における重要な段階である、腫瘍細胞の付着を促進する。付着は分解性酵素の放出を誘発し、これらが組織バリアーを超えて腫瘍細胞が侵入するのを促進する。一旦腫瘍細胞が標的組織に入っていると、さらなる増殖には特異的な増殖因子が要求される。腫瘍の浸潤および進行は複雑な一連の事象を伴って、そこにおいて腫瘍細胞は原発腫瘍から離脱し、それを囲んでいる正常組織を破壊し、そして血管もしくはリンパ管に移動して、遠隔部に運ばれる。正常組織のバリアーの破壊は、組織の基底膜および間質成分を作り上げている細胞外マトリックスのタンパク質を分解する、特異的な酵素の作用により達成される。

30

【0006】

一つのクラスの細胞外マトリックス分解酵素が腫瘍の浸潤に関与すると考えられている。これらの中にマトリックスメタロプロティナーゼ(MMP)がある。例えば、マトリックスメタロプロティナーゼであるストロメライシンの生産は、転移の潜在力を持つ悪性腫瘍に関連している(例えば、McDonnell et al. (1990) *Smnrs. in Cancer Biology* 1:107-115; McDonnell et al. (1990) *Cancer and Metastasis Reviews* 9:309-319、を参照)。

【0007】

がん細胞が転移して組織に浸潤する能力は、基底膜分解により促進される。MMPを含むいくつかのプロティナーゼ酵素は、腫瘍細胞の浸潤プロセスを促進すると報告されている。MMPは、基底膜の分解を促進し、それによって腫瘍細胞が組織に浸潤するのを許容すると報告されている。例えば、約70 kDaおよび92 kDaの分子量を有する二つの主要なメタロプロティナーゼは、腫瘍の転移する活性を促進するようである。

40

【0008】

I I型膜貫通型セリンプロテアーゼ(TTSP)

MMPに加えて、セリンプロテアーゼが腫瘍疾患の進行に関連があるとされている。分泌性酵素であるかもしくは細胞質の貯蔵小器官中に隔離されているかのどちらかである、殆どのセリンプロテアーゼは、血液凝固、創傷治癒、消化、免疫応答、ならびに腫瘍浸潤および転移に役割を有する。さらに別の細胞外ドメインを持つ膜結合型タンパク質である、I I型膜貫通型セリンプロテアーゼと呼称される一つのクラスの細胞表面タンパク質が同定されている。細胞表面タンパク質として、これらは、細胞内の情報伝達においておよび

50

細胞表面のタンパク質分解事象の仲介において役割を果たすように位置づけられる。

【0009】

細胞表面でのタンパク質分解は、種々の細胞機能を仲介する生物学的に活性なタンパク質の生成の機構である。膜関連プロテアーゼとしては、膜型メタロプロティナーゼ(MT-MMP)、ADAM(ディスインテグリン様およびメタロプロティナーゼドメインを含有するプロテアーゼ)、およびTSPが挙げられる。哺乳動物では、ヒトにおける7個を含む、TSPファミリーの少なくとも17個のメンバーが知られている(Hooper et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:857-860、を参照)。これらとしては：コリン(受け入れ番号AF133845およびAB013874; Yan et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:14926-14938; Tomia et al. (1998) J. Biochem. 124:784-789; Uan et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:8525-8529、を参照); エンテロペプチダーゼ(エンテロキナーゼとも呼称される; ヒトタンパク質の受け入れ番号U09860; Kitamoto et al. (1995) Biochem. 27: 4562-4568; Yahagi et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 219:806-812; Kitamoto et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:7588-7592; Matsushima et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:19976-19982、を参照); ヒト気道トリプシン様プロテアーゼ(HAT; 受け入れ番号AB002134; Yamaoka et al. J. Biol. Chem. 273:11894-11901、を参照); MTSPIおよびマトリプターゼ(TADG-15とも呼称される; 配列番号1および2、を参照; 受け入れ番号AF133086 / AF118224, AF04280022; Takeuchi et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:11054-1161; Lin et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:18231-18236; Takeuchi et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:26333-26342; and Kim et al. (1999) Immunogenetics 49:420-429); ヘプシン(受け入れ番号M18930, AF030065, X70900; Leytus et al. (1988) Biochem. 27: 11895-11901; Vu et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:31315-31320; and Farley et al. (1993) Biochem. Biophys. Acta 1173:350-352; および米国特許第5,972,616号、を参照); TMPRS2(受け入れ番号U75329およびAF113596; Paoloni-Giacobino et al. (1997) Genomics 44:309-320; およびJacquinet et al. (2000) FEBS Lett. 468: 93-100、を参照); ならびにTMPRSS4(受け入れ番号NM016425; Wallrapp et al. (2000) Cancer 60:2602-2606、を参照)が挙げられる。

【0010】

膜貫通型セリンプロテアーゼおよび分泌プロテアーゼを含む、セリンプロテアーゼは、腫瘍発生および進行に関わるプロセスに関連するとされている。これらのプロテアーゼが腫瘍成長および進行を促進する詳細なメカニズムは解明されていないが一方、セリンプロテアーゼおよびその阻害剤は、腫瘍進行に関与する、がん細胞浸潤における分解作用、転移による拡散、および腫瘍の血管新生を含む、多くの細胞内および細胞外の生理学的プロセスの制御に関与している。プロテアーゼは、細胞外マトリックス(ECM)の分解に関与して、組織の再構築に寄与して、そしてがんの浸潤および転移にとって必要であることが信じられている。或るプロテアーゼの活性および/発現は腫瘍の進行および発達と相関すると示されている。

【0011】

例えば、上皮がんおよび正常組織に発現している(Takeuchi et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1105461)、膜型セリンプロテアーゼMTSPI(マトリプターゼとも呼称される; 米国特許第5,972,616号からの配列番号1および2; ならびにGenBank受け入れ番号AF118224; (1999) J. Biol. Chem. 274:18231-18236; 米国特許第5,792,616号、を参照; また、Takeuchi (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:11054-1161、を参照)が同定されている。マトリプターゼは、初めヒト乳がんにおいて主要なゼラチナーゼとして同定され(米国特許第5,482,848号、を参照)、そして当初はマトリックスメタロプロティナーゼ(MMP)の一つのタイプと考えられた。これが乳がんの転移において役割を演じていることが提唱されている。マトリプターゼはまた、ヒトの消化管および前立腺において高レベルの活性および/もしくは発現を持って、種々の

上皮組織でも発現される。MTSP3、MTSP4、およびMTSP6と呼称されるMTSP類は、国際PCT出願第PCT/US01/03471号に基づく公開国際PCT出願第WO 01/57194号に記載されている。

【0012】

カリクレイン様プロテアーゼである前立腺特異抗原(PSA)は、細胞外マトリックスの糖タンパク質であるフィブロネクチンおよびラミニンを分解して、前立腺がん細胞による浸潤を促進すると想定されてきた(Webber et al. (1995) Clin. Cancer Res., 1(10):10899-4)。PSA特異的モノクローナル抗体によるPSAのタンパク質分解活性の阻止は、高レベルのPSAを分泌するヒト前立腺がん細胞LNCaPによる再構成基底膜マトリゲルの浸潤において用量依存性のインビトロにおける減少をもたらす。

10

【0013】

肝がん細胞に同定された細胞表面セリンプロテアーゼであるヘプシンは、卵巣がんで過剰発現される(Tanimoto et al. (1997) Cancer Res., 57(14):28847)。ヘプシンの転写物は、がん組織には大量に存在するように見えて、そして、正常な卵巣を含む、正常な成人組織では殆ど全く発現していない。ヘプシンは、卵巣がんでしばしば過剰発現されており、それ故に、卵巣腫瘍細胞の浸潤プロセスおよび成長能力における候補プロテアーゼであり得ることが示唆されている。

【0014】

正常上皮細胞特異的1(NES1)と称される、セリンプロテアーゼ様遺伝子(Liu et al., Cancer Res., 56(14):33719 (1996))が同定されている。NES1 mRNAの発現は、全ての正常および不死化非腫瘍性上皮細胞株で観察されるが、ヒト乳がん細胞株の大部分は、その発現の著しい減少もしくは完全な欠失を示す。増殖因子活性を調節することが知られているポリペプチドとNES1の構造類似性、およびNES1発現の乳がん発生との負の相関は、腫瘍発生の抑制におけるこのプロテアーゼ様遺伝子産物の直接的なもしくは間接的な役割を示唆する。

20

【0015】

したがって、膜貫通型セリンプロテアーゼは、腫瘍の病因および病理発生過程に関与していると思われる。これらのプロセスにおけるそれらの役割をさらに解明して、さらに別な膜貫通型プロテアーゼを同定する必要がある。それ故に、腫瘍発生および／もしくは発がんの調節に関与するかまたはそれらに関係している膜貫通型セリンプロテアーゼ(MTSP)タンパク質ならびにそのようなMTSPプロテアーゼをコード化する核酸を提供することが、本明細書における目的である。そのようなプロテアーゼおよびそのようなプロテアーゼをコード化する核酸を用いる予後的、診断的ならびに治療的なスクリーニングの方法を提供することはまた、本明細書における目的である。

30

(発明の概要)

【0016】

本明細書においては、膜貫通型セリンプロテアーゼファミリーのメンバー、特にII型膜貫通型セリンプロテアーゼ(TTSP)ファミリー(本明細書においてはMTSPとも呼称する)、ならびにさらに特別にはそれらの機能活性および／もしくは発現が腫瘍細胞において同組織の非腫瘍細胞と異なるTTSPファミリーメンバーが提供される。本明細書において提供されるMTSPは、本明細書においてMTSP9と称されるMTSPファミリーメンバーである。チモーゲンおよび活性化型を含む、プロテアーゼのドメインならびに完全長タンパク質、ならびにその使用がまた提供される。スプライス変異体によりコード化されるタンパク質がまた提供される。

40

【0017】

低分子を含む化合物のような、エフェクターの同定用のアッセイ、ならびにMTSP9の活性化、発現もしくは活性を調整するところのpH、温度およびイオン強度のような条件が、本明細書において提供される。例示的アッセイにおいて、MTSP9のプロテアーゼドメインが既知の基質を、典型的には蛍光的に、色素産生的にもしくはさもなければ検出可能なように標識された基質を、タンパク質分解的に切断する能力に及ぼす試験化合物の

50

作用が、評価される。プロテアーゼドメインの活性を調整する剤、一般的に化合物、特に低分子、はMTSP9の活性を調整する候補化合物である。プロテアーゼドメインをまた使用して、プロテアーゼ特異的抗体を生産することができる。本明細書に提供されるプロテアーゼのドメインとしては、例えば、腫瘍細胞において非腫瘍細胞とは異なるレベルで発現されるところのヒトを含む、哺乳動物に一般的に由来するMTSP9を含む、任意のMTSPファミリーメンバーの、タンパク質分解活性を単鎖ポリペプチドとしてインビトロタンパク質分解アッセイで発揮する、チモーゲン活性化のための切断部位にあるN末端からC末端までを有する単鎖領域、もしくはそのC末端が切断された部分が挙げられるが、これらに限定されない。

【0018】

タンパク質およびプロテアーゼドメインをコード化する核酸分子がまた、提供される。単鎖プロテアーゼドメインもしくはその触媒活性部分をコード化する核酸分子、およびまた完全長MTSP9をコード化するものが提供される。プロテアーゼドメインをコード化する核酸(ヌクレオチド31~729)および配列番号5で上流の核酸;ならびにMTSP9のプロテアーゼドメインは、配列番号6(アミノ酸11~232)および配列番号16に示される。完全長MTSP9のタンパク質配列およびコード化する核酸配列は、配列番号18および17に示される。

【0019】

また、そのようなMTSP9をコード化する核酸に、その完全長に沿って、もしくは完全長の少なくとも70%、80%もしくは90%に沿ってハイブリダイズして、プロテアーゼドメインもしくはその一部をコード化する核酸分子が提供される。ハイブリダイゼーションは、少なくとも低度の、一般的には少なくとも中度の、およびしばしば高度のストリンジェンシーの条件下で、一般的に達成される。

【0020】

単離核酸フラグメントは、ゲノムDNAもしくはcDNAを含む、DNAであるか、またはRNAであるか、またはタンパク質核酸もしくは他のヌクレオチド類似体のような他の成分を含むことができる。単離核酸は、異種のもしくは天然のプロモーター、ならびに他の転写および翻訳調節配列のような、さらに別の成分を含有し得て、これらの遺伝子は、レポーター遺伝子もしくは他のインディケーター遺伝子またはインディケーターをコード化する遺伝子のような、他の遺伝子に連結され得る。

また、MTSP9をコード化するヌクレオチド配列もしくはその一部に相補的であるところの分子の配列を含有する、単離核酸分子が提供される。

【0021】

また、プローブもしくはプライマーとして使用できて、配列番号5または17(もしくはその相補体)に示される少なくとも約10、14、16個のヌクレオチド、一般的には1000未満または100以下もしくは同一を含有するところの;または少なくとも約30個のヌクレオチド(もしくはその相補体)を含有するかまたはその完全長(またはその少なくとも約70、80もしくは90%)に沿ってそのようなフラグメントもしくはオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含有するところのそのフラグメントもしくはオリゴヌクレオチドが、提供される。フラグメントの長さはそれが使用される目的および/もしくは興味のあるゲノムの複雑さの関数である。一般的にプローブおよびプライマーは、約50、150もしくは500個のヌクレオチド未満を含有する。

また、本明細書に提供される任意の核酸分子を含有するプラスミドが提供される。プラスミドを含有する細胞がまた、提供される。そのような細胞としては、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

また、それによりMTSP9が細胞により発現され、発現したMTSP9ポリペプチドを回収する、条件下で上記の細胞を増殖させることによりMTSP9を生産する方法が、提供される。他のMTSP9をコード化する核酸を単離する方法がまた、提供される。

10

20

30

40

50

【0023】

また、MTSP9が細胞表面に発現される、細胞、一般的には哺乳動物細胞および酵母細胞のような、真核細胞が提供される。そのような細胞を剤スクリーニングアッセイに使用して、MTSP9ポリペプチドの活性を調整する化合物を同定する。インビトロ結合アッセイを含む、これらのアッセイ、およびMTSP9による増殖因子前駆体の活性化を介するような、直接的にもしくは間接的に情報伝達を介するところの転写に基づくアッセイが評価される。

【0024】

また、そのような核酸分子によりコード化されるペプチドが提供される。それらのポリペプチドの中には、MTSP9のプロテアーゼドメインまたは特異性および／もしくはプロ
10
テアーゼ活性が実質的に不変なままであるアミノ酸の変化を持つポリペプチドが、含まれる。特に、セリンプロテアーゼの触媒ドメインを含有し、そして加えて他のドメインを含有し得るところの実質的に精製された哺乳動物のMTSP9ポリペプチドが提供される。MTSP9は、ホモダイマーを形成することができて、そしてまた膜結合タンパク質のような、何らかの他のタンパク質とヘテロダイマーを形成することができる。また、MTSP9に少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、
86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、
96%、97%、98%、99%の同一性を有する、アミノ酸配列を含有する実質的に精
20
製されたタンパク質が、提供されて、そこではパーセント同一性は、標準的アルゴリズムおよびパーセンテージ同一性を最大にするギャップペナルティーを用いて決定される。他の哺乳動物のMTSP9ポリペプチドが意図されるが、ヒトMTSP9ポリペプチドが例示される。MTSP9のスプライス変異体、特にタンパク質分解的に活性なプロテアーゼドメインを持つもの、が本明細書において意図される。

【0025】

他の実施態様では、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分を含有するが、配列番号18に示すアミノ酸の完全な配列を含有しないところの実質的に精製されたポリペプチドが、提供される。これらの中には、配列番号16または18に対して少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含むポリペプチドがある。

【0026】

特定の実施態様では、MTSP9と呼称されるMTSPをコード化する核酸が提供される。特に、核酸は、配列番号5に示される、特に配列番号5のもしくは配列番号17のヌクレオチド31～729として示される、ヌクレオチド配列、または触媒的に活性なポリペ
30
プチドをコード化するその一部分を含む。

また、配列番号5もしくは17またはその縮重体に少なくとも低度のストリンジェンシー、一般的には中度のストリンジェンシー、さらに典型的には高度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする核酸が、提供される。

【0027】

一つの実施態様では、単離核酸フラグメントは、高度のストリンジェンシー下で配列番号5もしくは17に示すヌクレオチド配列(またはその縮重体)にハイブリダイズし、一つの
40
実施態様では、配列番号5および7に示すヌクレオチド配列を含有する。完全長MTSP9は配列番号18に示されて、配列番号17もしくはその縮重体によりコード化される。

【0028】

また、MTSP9の単鎖プロテアーゼドメインの突然変異タンパク質、特にプロテアーゼドメイン中のフリーな(即ち、プロテアーゼドメイン中の他のCys残基のいずれともジスルフィド結合を形成しない)Cys残基がさらに別のアミノ酸置換基、典型的に、必ずしもそうでなくてもよいが、保存的アミノ酸置換基もしくは活性を消失させない置換基で置換された突然変異タンパク質、および糖鎖形成部位が除去された突然変異タンパク質が、提供される。

【0029】

10

20

30

40

50

したがって、C y s 残基の一つもしくはそれ以上、特に活性化された二つの形では対をなしているがプロテアーゼドメイン単独では対をなしていない残基(即ち、プロテアーゼドメイン中の26番目の部位のC y s 残基(配列番号5、6および16を参照))が任意のアミノ酸、特に、必ずしもそうでなくてもよいが、S e rのような保存的アミノ酸残基により置換されるところの突然変異タンパク質が意図される。M T S P 9の突然変異タンパク質、特に、単鎖プロテアーゼドメイン中の不對C y sのようなC y s 残基が活性を消失しないさらに別のアミノ酸で置換されているものが、提供される。触媒活性が保持されている他の保存的もしくは非保存的アミノ酸置換を有する突然変異タンパク質がまた、意図される(例示的なアミノ酸置換については、例えば、表1を参照)。

【0030】

10

そのスプライス変異体を含むが、それらに限定されない、M T S P 9ポリペプチド、ならびにM T S P、ならびにそれらのドメイン、誘導体およびその類似体をコード化する核酸が、本明細書において提供される。M T S P 9のチモーゲン型の活性化により生成するものに機能的に等価なN末端を有する、単鎖プロテアーゼドメインがまた、提供される。M T S P 9のプロテアーゼドメインに対する切断部位は、アミノ酸R₁₈₆およびアミノ酸I₁₈₇の間(R(下矢)I A S G)にある。N₁₅₃およびN₃₀₃において二つの潜在的糖鎖形成部位が存在する。C y s 残基C₁₇₅~C₂₉₂の間でジスルフィド結合が形成して、プロテアーゼドメインをもう一つのドメインと結合しているため、切断により得られるポリペプチドは二本鎖の分子となる。以下のような潜在的ジスルフィド結合がある：C₂₁₂~C₂₂₈、C₃₃₇~C₃₅₃、およびC₃₅₄~C₃₉₃。したがって、C₂₉₂は、二本鎖分子としても提供され得る、プロテアーゼドメインの単鎖ドメイン中のフリーなC y sである。しかしながら、単鎖および二本鎖型はタンパク質分解的に活性であることが本明細書において示される。

20

【0031】

したがって、M T S P 9と呼称される膜貫通型セリンプロテアーゼ(M T S P)タンパク質のファミリーおよびその機能ドメイン、特にそのプロテアーゼ(もしくは触媒)ドメイン、突然変異タンパク質ならびにそれらの他の誘導体および類似体が、本明細書において提供される。また、M T S P 9をコード化する核酸が、本明細書において提供される。

【0032】

M T S Pは、それらが、腫瘍細胞中では正常細胞とは異なるレベルで発現されおよび／もしくは活性化され、または腫瘍細胞中ではその基質もしくは補因子の変化によるような、正常細胞とは異なる機能活性を有するらしいので、興味を持たれる。M T S P 9は、それが腫瘍細胞で発現されもしくは活性であるので、興味を持たれる。したがって、本明細書において提供されるM T S P 9は、特定の腫瘍の診断マーカーとして役に立つことができる。

30

【0033】

本明細書において興味を持たれるのは、肺、前立腺、結腸および乳房のがんのような特定の腫瘍もしくはがん細胞において発現または活性化される、M T S P 9である。特に、M T S P 9が、例えば、肺がん、白血病および子宮頸がんを含む、種々の腫瘍細胞でならびに特定の正常細胞および組織で発現されるおよび／もしくは活性化されていることが本明細書において示される(例えば、組織特異的発現プロファイルについての実施例、を参照)。M T S P 9はまた、乳がん、前立腺がんおよび結腸がんのマーカーであり得る。対象中の細胞上もしくは近傍または体液中におけるM T S P 9の発現および／または活性化は、乳房の、前立腺の、肺の、結腸のならびに他のがんのマーカーとなり得る。

40

【0034】

特定の実施態様では、M T S P 9ポリペプチドは、腫瘍を有しない対象の体液中のレベルとは異なるレベルで体液中に検出可能である。他の実施態様では、ポリペプチドは腫瘍中に存在し；そしてポリペプチドの基質もしくは補因子は、同じタイプの組織において非腫瘍細胞におけるその発現レベルとは異なるレベルで発現される。他の実施態様では、腫瘍細胞中におけるM T S P 9ポリペプチドの発現および／もしくは活性のレベルは、非腫瘍

50

細胞におけるその発現および／もしくは活性のレベルとは異なる。他の実施態様では、MTSP9は腫瘍中に存在し；そしてMTSP9の基質もしくは補因子は、同じタイプの組織中において非腫瘍におけるその発現レベルとは異なるレベルで発現される。

【0035】

また、MTSP9の活性を調整する化合物をスクリーニングする方法が提供される。化合物は、それらをMTSP9もしくはそのプロテアーゼドメインおよびMTSP9の基質と接触させることにより同定される。化合物の不在下と比較しての化合物の存在下で切断された基質の量の変化は、化合物がMTSP9の活性を調整することを示す。そのような化合物は、さらなる分析のために、または阻害剤もしくはアゴニストのように、MTSP9活性を調整するのに使用するために、選択される。化合物はまた、基質をMTSP9もしくはその細胞外ドメインまたはタンパク質分解的に活性なその部分を発現する、細胞と接触させることによって、同定されることができる。

10

【0036】

また、MTSP9の活性を調整する方法、およびMTSP9の活性を阻害し、拮抗し、作動し、さもなければ変化することを含む調節を行うところの化合物のスクリーニングが、本明細書において提供される。特に興味を持たれるのは、タンパク質のタンパク質分解活性(触媒的)部分を含む、MTSP9の細胞外ドメインである。

【0037】

コード化する核酸を含有する細胞、組合せ、MTSP9ポリペプチド、そのドメイン、もしくはキットおよび製造品目がまた、本明細書において提供される。コード化されたMTSP9ポリペプチドおよびその一部を細胞を用いて発現させる方法、および細胞表面にMTSP9を発現する細胞が、また提供される。そのような細胞は、候補治療用化合物を同定する方法に使用される。

20

【0038】

単鎖および二本鎖形のMTSP9に特異的に結合する抗体、抗体を含有する細胞、組合せ、キットおよび製造品目が、加えて提供される。MTSP9、特に単鎖プロテアーゼドメイン、二本鎖型のプロテアーゼドメイン、チモーゲン、および活性化型のMTSP9およびそれらの他のフラグメントに特異的に結合する抗体が、また提供される。生物活性、特にプロテアーゼ活性を阻害する、中和抗体がまた提供される。

【0039】

MTSP9およびMTSP9をコード化する核酸を用いる予後的、診断的、治療的スクリーニング方法が、本明細書においてさらに提供される。特に、予後的、診断的、および治療的スクリーニング方法は、肺がん、結腸がん、および卵巣がんのような腫瘍もしくはがんを予防し、処置するために、または、それらを予防もしくは処置するのに有用な剤を見出すために、使用される。

30

また、MTSP9活性のモジュレーター、特に本明細書に提供されるスクリーニング方法により得られるモジュレーターが、本明細書に提供される。そのようなモジュレーターは、がん性異常および他の腫瘍性異常の処置に使用を有することができる。

【0040】

対象中に異常なレベルのMTSP9を検出することを特徴とする、疾患もしくは障害を診断する方法が、提供される。方法は、MTSP9のDNA、RNA、タンパク質もしくは機能活性のレベルを測定することにより実施されることができる。疾患もしくは障害を有しない類似のサンプル(もしくは他の適当な対照)に見出されるDNA、RNA、タンパク質もしくは機能活性のレベルと比べて、MTSPのDNA、RNA、タンパク質もしくは機能活性のレベルの増加または減少は、対象もしくは相対的な任意の他の適当な対照における疾患もしくは障害の存在を示す。

40

【0041】

また、単鎖および／もしくは二本鎖型のMTSP9に結合する化合物を、試験化合物を両者の型と接触させること；化合物が結合する型を決定すること；および；もしそれがMTSP9の一つの型に結合するならば、化合物が以下の性質の少なくとも一つを有している

50

か否かをさらに決定すること、により同定する方法が、提供される：

- (i) 単鎖チモーゲン型のMTSP9の活性化を阻害する；
- (ii) 二本鎖もしくは単鎖の型の活性を阻害する；および
- (iii) タンパク質の二量体化を阻害する。

型は完全長、または活性化切断部位(アミノ酸R₁₈₅およびI₁₈₆の間)での切断から；またはプロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分の発現から生じるプロテアーゼドメインを含むが、それに限定されない、切断型であり得る。

【0042】

薬学的に許容される担体もしくは賦形剤中で、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインおよび／もしくは完全長または他のドメインを含有する医薬組成物が、本明細書において提供される。 10

また、MTSP9ポリペプチドおよび単鎖型もしくは活性型にあるMTSP9のプロテアーゼドメインを含有する、製造品目が、提供される。品目はa)包装材；b)ポリペプチド(もしくはコード化する核酸)、特にその単鎖プロテアーゼドメイン；およびc)MTSP9ポリペプチドの活性のモジュレーターを同定するためのアッセイに使用される品目がそこにおいて提供されることを示すラベルを含有する。

【0043】

a) MTSP9または単鎖もしくは二本鎖型のプロテアーゼドメイン；およびb) MTSPに直接にもしくはリンカーを介して結合したターゲティング剤を含有する結合体が本明細書において提供されるが、そこではその剤は、i) 結合体の親和性単離および精製；ii) 結合体の表面への付着；iii) 結合体の検出；またはIV) 選択された組織もしくは細胞への目標を定めた送達、を容易にする。結合体は、それに結合された複数の剤を含有することができる。結合体は、化学的な結合体であり得て；そしてそれは融合タンパク質であり得る。ターゲティング剤は、タンパク質もしくはペプチドフラグメントであり得る。タンパク質またはペプチドフラグメントは、タンパク質結合配列、核酸結合配列、脂質結合配列、多糖類結合配列、もしくは金属結合配列を含み得る。 20

【0044】

組合せが本明細書において提供される。組合せは、a) MTSP9の活性の阻害剤；およびb) 抗がん処置剤もしくは剤を含み得る。MTSP9阻害剤および抗がん剤は単一の医薬組成物中に処方され得るか、もしくはそれぞれが別々の医薬組成物に処方される。MTSP9阻害剤は、プロテアーゼドメインに特異的に結合する抗体のようなMTSPに対して作成された抗体またはそのフラグメントもしくは結合部分、MTSP9生産の阻害剤、またはMTSP9膜局在の阻害剤、もしくはMTSP9活性化の阻害剤であり得る。他のMTSP9阻害剤としては、アンチセンス核酸もしくはMTSP9、特にプロテアーゼドメインをコード化するRNAiのような、二重鎖RNA(dsRNA)；異種の配列がコード化されたMTSP9もしくはそれをコード化する遺伝子の生物活性を不活化するように異種の配列がその中に挿入された、異種の配列を持つMTSP9をコード化する遺伝子の少なくとも一部をコード化する核酸、が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、MTSP9をコード化する遺伝子の一部が異種の配列に隣接して、MTSP9をコード化するゲノム遺伝子との相同組換えを促進することができる。 30 40

【0045】

また、MTSP9の阻害剤の有効量を哺乳動物に投与することにより哺乳動物中の腫瘍もしくはがんを処置もしくは予防する方法が、提供されて、これにより腫瘍またはがんが処置されるかもしくは予防される。処置もしくは予防のために使用されるMTSP9阻害剤は、薬学的に許容される担体もしくは添加剤と共に投与される。処置される哺乳動物はヒトであり得る。これに加えて、処置もしくは予防の方法は、MTSP9阻害剤の投与と同時に、引き続いて、もしくは以前に抗がん処置剤もしくは抗がん剤を投与することを含む。

【0046】

また、MTSPをコード化する不活化遺伝子を保有しそして非天然のプロモーターの下で 50

M T S P 9をコード化する遺伝子を保有する非ヒトトランスジェニック動物が提供される。そのような動物は、腫瘍の開始、成長および／もしくは進行モデルの動物モデルとして有用である。天然、非天然プロモーターの制御下で、またはプラスミドもしくは人工染色体のような外来性要素上で、異種の核酸M T S P 9を含有する非ヒトトランスジェニック動物が、本明細書においてこれに加えて提供される。特に、非ヒト遺伝子組換え動物が本明細書において提供されるが、そこではM T S P 9の遺伝子は、遺伝子の天然のプロモーターではないか、もしくは非ヒト動物の遺伝子の天然のプロモーターではないプロモーターの制御下にあり、またはそこではM T S P 9をコード化する核酸は、非ヒト動物と異種であって、プロモーターは、天然もしくは非天然プロモーターであるか、またはM T S P 9は、プラスミドもしくは人工染色体のような、染色体外の要素上にある。遺伝子組換えおよびトランスジェニック動物を、相同組換えおよび異種組換え方法により生産することができる。

10

【0047】

遺伝子治療の方法が提供される。そのような方法は、不活化型のM T S P 9をインビトロもしくはインビボで投与することにより、またはM T S Pをコード化する核酸分子を投与することにより成し遂げられる。

また、腫瘍細胞、特にその機能活性が非腫瘍細胞におけるより腫瘍細胞においてより大きいものの中に発現されるかもしくは活性のあるM T S P 9により活性化される、プロドラッグを投与することによる腫瘍の処置方法が、提供される。プロドラッグが投与されると、投与に際して、細胞上に発現された活性なM T S P 9が、プロドラッグを切断して、活性な薬物を腫瘍細胞の近傍に放出する。活性な抗がん薬が腫瘍の近傍に蓄積する。M T S P 9が、腫瘍細胞において他の細胞と比較してより大量に、高レベルにもしくは優勢に発現されるかまたは活性である場合に、これは特に有用である。

20

【0048】

また、対象から生物学的試料を採取し；それを二本鎖および／もしくは単鎖の型のM T S P 9に結合する検出可能な剤に曝露させることにより、対象における前がん病変、悪性病変、もしくは他の病態の存在を診断する方法が、提供されるが、そこでは病態は二本鎖および／もしくは単鎖の型の存在または不在を特徴とする。

【0049】

チモーゲン型のM T S Pの活性化、もしくは活性型の活性を阻害する、剤を投与することにより腫瘍の浸潤もしくは転移を阻止するか、または悪性もしくは前がん性の異常を処置する方法が提供される。異常としては、乳房の、子宮頸の、前立腺の、肺の、卵巣のもしくは結腸の腫瘍のような異常が挙げられるが、これらに限定されない。

30

発明の詳細な説明

【0050】

A. 定義

別に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者により共通に理解されているのと同じ意味を有している。本明細書の全ての開示に亘って参照されている全ての特許、特許出願、公開出願および公表文献、Genbank配列、ウェブサイトおよび他の公表された資料は、別に記載のない限り、全体的な出典明示により本明細書の一部とする。本明細書の用語に複数の定義がある場合には、本項のものが優先する。U R Lもしくは他のそのような識別子またはアドレスが参照される場合は、そのような識別子は変化し得て、そしてインターネット上の特定の情報は掲載されたり掲載されなくなったりし得るが、インターネットを検索することにより同等の情報を見出すことができることが理解される。それに対する参照はそのような情報の入手可能性および公けにおける普及を立証する。

40

【0051】

本明細書において使用されるように、任意の保護基、アミノ酸および他の化合物の略号は、別に指示がない限り、共通の用法、認められた略号、もしくはI U P A C - I U B生化学命名法((1972) Biochem. 11:942-944、を参照)に一致する。

50

【0052】

本明細書において使用されるように、セリンプロテアーゼとは、タンパク質もしくはペプチドの加水分解にセリン残基が関与する、プロテアーゼの種々のファミリーを指す。セリン残基は、触媒作用においてセリン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸を含む触媒三つ組機構の一部、または触媒作用においてセリンおよびリジンを伴うヒドロキシル／ε-アミノもしくはヒドロキシル／α-アミンの触媒二つ組機構の一部であり得る。ヒトを含む哺乳動物起源のSPが特に興味深い。一般的に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換は生物活性を実質的に変化させないことを当業者は認識している(例えばWatson et al. (1987)、「遺伝子の分子生物学、第4版」、The Bejacmin/Cummings Pub. co., p.224を参照)。

10

【0053】

本明細書において使用されるように、「膜貫通型セリンプロテアーゼ(MTSP)」とは、本明細書に説明される共通な構造的特徴を共有する膜貫通型セリンプロテアーゼのファミリーを指す(Hooper et al. (2001) J. Biol. Chem.276:857-860をまた参照)。かくして、例えば「MTSP」への参照は、MTSP遺伝子ファミリーによりコード化される全てのタンパク質を包含し、MTSP3、MTSP4、MTSP6、MTSP7または他の任意の供給源より得られた同等の分子、もしくは合成的に調製されたもの、または同一の活性を発揮するものを含むが、これらに限定されない。他のMTSPとしては、コリン、エンテロペプチダーゼ、ヒト気道トリプシン様プロテアーゼ(HAT)、MTSP1、TMPRSS2およびTMPRSS4が挙げられるが、これらに限定されない。例示的MTSPおよび／もしくはそのドメインのコード化する核酸分子の配列およびコード化されたアミノ酸配列を、例えば、米国出願一連番号第09／776,191号(その中の配列番号1～12、49、50および61～72は国際PCT出願第WO 01／57194号として公開される)に示す。この用語はまた、それぞれのメンバーの活性を実質的に変化させないアミノ酸置換を持つMTSPおよびそのスプライス変異体を包含する。アミノ酸の保存的置換を必須でなく含む適当な置換は当業者に公知であり、得られる分子の触媒活性のような、生物活性を消失させることなく作成されることができる。

20

【0054】

本明細書において使用されるように、MTSP9は、本明細書において参照される場合は常に、配列番号17に示されるヌクレオチド配列により、もしくは配列番号6のアミノ酸11～232をコード化するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列によりによりコード化されるポリペプチド；

30

配列番号5のヌクレオチドとしてもしくは配列番号17として示されるヌクレオチド配列に低度、中度、もしくは高度のストリンジェンシーの条件下にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列によりコード化されるポリペプチド；

配列番号6のアミノ酸11～232として示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号17もしくは18に示されるアミノ酸、または配列番号6のアミノ酸11～232として示されるアミノ酸の配列と少なくとも約60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および／もしくは

40

配列番号17に示されるMTSP9のスプライス変異体によりコード化されるポリペプチド；

の少なくとも一つもしくは全てまたは任意の組合せを含む。

【0055】

特に、配列番号5、6、16、17および18に示されるように、プロテアーゼドメインを持つ、MTSP9ポリペプチドが提供される。ポリペプチドは単鎖もしくは二本鎖ポリペプチドである。プロテアーゼ活性を保持するそのさらに小さなタンパク質がまた提供される。MTSP由来のプロテアーゼドメインは、表面ループにおける挿入および欠失を含んで、サイズおよび構成を異にする。それらは、活性部位三つ組(例えば、配列番号18

50

のMTSP9の触媒三つ組は、H₂₂₇、D₂₇₂およびS₃₆₈であることを参照)、主要特異性ポケット、オキシアニオンホールおよび／もしくはプロテアーゼのセリンプロテアーゼドメインの他の特徴の少なくとも一つを含む、保存された構造を保持する。かくして、本明細書の目的のためには、プロテアーゼドメインは、本明細書に規定されるMTSPの一部であり、そして先に同定されてはいたところのコリン、エンテロペプチダーゼ、ヒト気道トリプシン様プロテアーゼ(HAT)、MTSP1、TMPRSS2およびTMPRSS4のような他のMTSPのドメインに相同である；しかしながら、単離された単鎖型プロテアーゼドメインがインビトロアッセイでタンパク質分解的に機能し得たことは認識されていなかった。キモトリプシン(S1)フォールドのさらに大きなクラスの酵素(例えば、インターネットでアクセス可能なMEROPSデータベースを参照)と同様に、MTSP 10
Pのプロテアーゼドメインは高度のアミノ酸配列同一性を共有する。活性に必要なHis、AspおよびSer残基は保存モチーフ中に存在する。二本鎖型中の2番目の鎖のN末端をもたらず、活性化部位は、保存モチーフ中に位置して、容易に同定可能である。

【0056】

MTSP9は任意の動物特に哺乳動物由来であり得て、そしてヒト、げっ歯類、鳥類、反芻動物、および他の動物が挙げられるが、これらに限定されない。完全長チモゲンもしくは二本鎖活性化型、または二本鎖活性化型もしくは単鎖型であり得るプロテアーゼドメインを含むその任意のドメインが意図される。

【0057】

本明細書において使用されるように、'MTSPのプロテアーゼドメイン'とは、タンパク質分解活性を発揮しそしてキモトリプシン／トリプシンファミリーのプロテアーゼドメインと相同性および構造的特徴を共有する、MTSPの細胞外プロテアーゼドメインを指す。したがってそれは、標準的なインビトロアッセイで評価されるタンパク質分解酵素活性を発揮するところのドメインの少なくとも最小部分である。そのようなプロテアーゼドメインおよびその触媒的に活性な部分が本明細書において意図される。また、単鎖型として触媒的に作用するところのその最小のフラグメントを含む、切断型のプロテアーゼドメインが提供される。

20

【0058】

MTSP9のプロテアーゼドメインは、本明細書において参照される場合は常に、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

30

配列15もしくは17に示されるヌクレオチド配列に低度、中度、もしくは高度にストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコード化されるポリペプチド；

配列番号6、16もしくは18に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号6、16もしくは18に示されるアミノ酸配列に少なくとも約60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および／またはMTSP9のスプライス変異体によりコード化されるポリペプチドのプロテアーゼドメイン；

40

の触媒的に活性な部分の少なくとも一つもしくは全てまたは任意の組合せを含む。

【0059】

MTSPのプロテアーゼドメインは、表面ループにおける挿入および欠失を含んでサイズおよび構成を異にする。それらは、活性部位三つ組、主要特異性ポケット、オキシアニオンホールおよび／もしくはプロテアーゼのセリンプロテアーゼドメインの他の特徴の少なくとも一つを含む、保存された構造を保持する。かくして、本明細書の目的のためには、プロテアーゼドメインは、本明細書に規定されるように、MTSPの一部であって、他のMTSPのドメインに相同である。キモトリプシン(S1)フォールドのさらに大きなクラスの酵素(例えば、インターネットでアクセス可能なMEROPSデータベース、を参照)と同様に、MTSPのプロテアーゼドメインは高度のアミノ酸配列同一性を共有する。活性に必

50

要なHis、AspおよびSer残基は保存モチーフ中に存在する。その切断が二本鎖型中の2番目の鎖のN末端を創成する活性化部位は保存モチーフ中に位置して、容易に同定可能である。

【0060】

活性型とは、インビボおよび／もしくはインビトロで活性な型を意味する。本明細書に説明されるように、プロテアーゼドメインはまた、二本鎖型としても存在し得る。少なくともインビトロにおいては、SPの単鎖型およびその触媒ドメインもしくはそのタンパク質分解的に活性な部分(典型的にはC末端切断)がタンパク質分解活性を発揮することが本明細書に示される。したがって、SPの単離された単鎖型プロテアーゼドメインおよびその活性を調整する剤の同定用のインビトロ剤スクリーニングアッセイにおけるそれらの使用が、本明細書において提供される。 10

【0061】

本明細書において使用されるように、MTSPの触媒活性ドメインとは、プロテアーゼドメインを指す。MTSPのプロテアーゼドメインへの参照は一般的に、タンパク質の単鎖型を指す。二本鎖型もしくは両者の型を意図するならば、そのように特定される。それぞれのタンパク質のチモーゲン型は単鎖型であり、それは活性化切断により活性な二本鎖型に変換される。

【0062】

本明細書において使用されるように、活性化切断とは、切断に際してプロテアーゼドメインのN末端(この場合には、R₁₈₅とI₁₈₆の間；配列番号12および13を参照して)におけるプロテアーゼの切断を指す。切断に際して、プロテアーゼドメイン外のCys(この場合、例えばC₁₇₅)およびプロテアーゼドメイン内のCys(この場合には、Cys₂₉₂)との間のCys-Cys対のお陰で、得られたポリペプチドは二本鎖('A'鎖およびプロテアーゼドメインである'B'鎖)を有する。切断は、さらに別のプロテアーゼにより、もしくは自己触媒的に行われることができる。 20

【0063】

本明細書において使用されるように、二本鎖型のプロテアーゼドメインとは、二本鎖型のプロテアーゼから生成する二本鎖を指し、そこでは、この場合Cys₁₇₅とCys₂₉₂の間のCys対がプロテアーゼドメインをポリペプチドの残余である'A'鎖と結合する。二本鎖プロテアーゼドメイン型とは、'ポリペプチドの残余'即ち'A'鎖が短くなりCys₁₇₅からを含む任意の型を指す。 30

【0064】

興味のあるMTSPは、非腫瘍細胞とは、典型的にはより高度に、異なる腫瘍細胞において活性化および／もしくは発現されているもの；およびそのための基質が腫瘍細胞において非腫瘍細胞と異なるか、または基質、補因子もしくは受容体に関して異なっている、またはそうでなければMTSPの活性もしくは特異性を変えているところの細胞由来のものを含む。

△F△F 本明細書において使用されるように、ヒトタンパク質は、ヒトのゲノム中に存在するDNAのような核酸によりコード化されるものであり、全ての対立遺伝子変異体および保存的変異体を、それらが他の哺乳動物に見出される変異体でない限りに、含む。 40

【0065】

本明細書において使用されるように、'SPのプロテアーゼドメインもしくは触媒的に活性な部分をコード化する核酸'とは、記述された単鎖プロテアーゼドメインもしくはその活性部分のみで、連続的配列としてSPの他の近接した部分ではなくコード化する核酸は指すものとする。

【0066】

本明細書において使用されるように、触媒活性とは、セリンプロテアーゼとしてのSPの活性を指す。SPの機能とは、腫瘍生物学におけるその機能を指し、腫瘍の開始、成長もしくは進行における促進もしくは関与、およびまた情報伝達における役割を含む。触媒活性とは、選択された基質のタンパク質分解を検出するインビトロタンパク質分解アッセイ 50

で評価されるプロテアーゼとしてのS Pの活性を指す。

【0067】

本明細書において使用されるように、チモーゲンとは、タンパク質分解酵素の不活性前駆体である。そのような前駆体は活性型よりも、必須ではないが、一般的により大きい。セリンプロテアーゼに関しては、チモーゲンは触媒的および自己触媒的切断を含む特異的切断により、もしくは活性酵素を生成する活性化補因子の結合により、活性な酵素に変換される。チモーゲンはかくして、活性化因子の作用によりタンパク質分解酵素に変換される、酵素的に不活性なタンパク質である。

本明細書において使用されるように、'疾患もしくは障害'とは、例えば、感染もしくは遺伝的欠陥によりまたらされて同定可能な症状を特徴とする、生物における病態を指す。

10

【0068】

本明細書において使用されるように、新生物形成(腫瘍形成)とは、異常な新たな成長を指し、かくして、良性もしくは悪性の腫瘍と同じ意味である。過形成とは異なり、新形成の増殖は元の刺激の不在下でも持続する。

本明細書において使用されるように、新生物形成性疾患とは、腫瘍発生、成長、転移および進行を含む、がんを伴う任意の障害を指す。

【0069】

本明細書において使用されるように、がんとは、任意の種類の悪性腫瘍により引き起こされる疾患の一般的用語を指す。

20

本明細書において使用されるように、腫瘍に適用される悪性とは、成長制御および位置制御を消失した転移能力を有する原発腫瘍を指す。

【0070】

本明細書において使用されるように、抗がん剤('抗腫瘍もしくは抗新生物剤'と互換的に使用される)とは、抗がん処置において使用される任意の剤を指す。これらは、単独もしくは他の化合物との組合せで使用したときには、新生物形成性疾患、腫瘍およびがんに関連する臨床症状もしくは診断マーカーを軽減し、減少し、改善し、予防するか、または寛解の状態に置くかもしくは維持することのできる任意の剤を含み、そして本明細書に提供される方法、組合せおよび組成物で使用されることができる。抗新生物剤の限定されない例としては、抗血管新生剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、特定の天然産物、プラチナ配位結合錯体、アントラセンジオン、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、特定のホルモン、アンタゴニストおよび抗がん性多糖類が挙げられる。

30

【0071】

本明細書において使用されるように、スプライス変異体とは、二つ以上のタイプのmRNAをもたらすDNAのような、ゲノム核酸の一次転写物の示差処理により生産される変異体を指す。S Pのスプライス変異体の本明細書において提供される。

【0072】

本明細書において使用されるように、血管新生とは、新しい血管系の確立および維持(新血管新生)に直接もしくは間接に関与する全てのプロセスを広く包含するものとし、腫瘍を伴う新血管新生を含むが、これに限定されない。

40

【0073】

本明細書において使用されるように、抗血管新生的処置もしくは剤とは、単独または他の処置もしくは化合物との組合せで使用したときには、望ましくないおよび／もしくは制御されない血管新生に関連する臨床症状または診断マーカーを軽減し、減少し、改善し、予防するか、もしくは寛解の状態に置くかまたは維持する任意の治療レジメンおよび化合物を指す。かくして本明細書の目的には、抗血管新生剤とは、血管系の確立もしくは維持を阻害する剤を指す。そのような剤としては、抗腫瘍剤、ならびに糖尿病性網膜症、再狭窄、過剰増殖性障害およびその他のような、望ましくない血管新生に関連する他の障害の処置のための剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

50

本明細書において使用されるように、非抗血管新生性抗腫瘍剤とは、血管新生を阻害することにより主として作用しない、抗腫瘍剤を指す。

本明細書において使用されるように、血管新生促進剤とは、血管系の確立および維持を促進する剤である。そのような剤としては、心臓発作および脳卒中を含む、心臓血管系障害を処置する剤が挙げられる。

【0075】

本明細書において使用されるように、望ましくないおよび／もしくは制御されない血管新生とは、血管新生促進剤の影響が血管新生阻害剤の影響に優っている、病的血管新生を指す。本明細書において使用されるように、欠陥のある血管新生とは、異常血管新生もしくは血管新生の不在もしくは実質的減少をもたらす正常な血管新生の欠陥が在る、障害に關与する病的血管新生を指す。

10

【0076】

本明細書において使用されるように、S Pタンパク質のプロテアーゼドメインとは、タンパク質分解活性を発揮するS Pのプロテアーゼドメインを指す。したがってそれは、標準的なインビトロアッセイで評価されるように、プロテアーゼ活性を発揮する、タンパク質の少なくとも最小の部分である。本明細書においてはそれは単鎖型およびまた二本鎖の活性型(二本鎖を意図する場合にはその旨記述する)を指す。例示的プロテアーゼドメインは、プロテアーゼ活性を発揮するために配列番号6に示すアミノ酸配列(配列番号5のヌクレオチドによりコード化される)の少なくとも十分な部分を含む。

【0077】

また、インビトロタンパク質分解アッセイでタンパク質分解活性を有し、そしてM T S P 9ポリペプチドの完全長のプロテアーゼドメインに少なくとも60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するポリペプチドをコード化するか、またはその完全長に沿ってもしくは完全長の少なくとも約70%、80%、もしくは90%に沿って、プロテアーゼドメインをコード化するところの核酸と特に中度、一般的には高度のストリンジェンシーでハイブリダイズする、核酸分子が、意図される。

20

【0078】

プロテアーゼドメインとしては、N末端の残基が活性に必須であり得る。M T S P 9プロテアーゼの単鎖型のプロテアーゼドメインは触媒的に活性であることが、本明細書において示される。したがって、プロテアーゼドメインは一般的に、活性のためにそのN末端アミノ酸を必要とし；C末端部分は先端を切り得る。除去可能な量は、触媒的切断を評価するインビトロアッセイにおいてポリペプチドのプロテアーゼ活性を試験することにより経験的に決定されることができる。

30

【0079】

したがって、プロテアーゼドメイン、特にプロテアーゼ活性を保持するその単鎖ドメインのさらに小さな部分が意図される。そのようなさらに小さな変種は一般的に、プロテアーゼドメインのC末端の先端を切った変種である。プロテアーゼドメインは、表面ループにおける挿入および欠失を含んで、サイズおよび構成を異にする。そのようなドメインは、活性部位三つ組、主要特異性ポケット、オキシアニオンホールおよび／もしくはプロテアーゼのセリンプロテアーゼドメインの他の特徴の少なくとも一つを含む、保存された構造を示す。かくして、本明細書の目的には、プロテアーゼドメインは、本明細書に規定されたM T S P 9の単鎖部分であるが、その構造的特徴および類似性もしくは相同性の配列の保持において、キモトリプシンもしくはトリプシンのプロテアーゼドメインと相同である。ポリペプチドは単鎖としてタンパク質活性を示す。

40

【0080】

本明細書において使用されるように、相同性とは、25%、40%、60%、70%、80%、90%もしくは95%のような、約25%より大きい核酸配列の同一性を意味する。必要な場合にはホモロジーのパーセンテージを特定する。用語''相同性''および''同一

50

性''はしばしば互換的に使用される。一般に、配列は最も高度の一致が得られるように整列させる(例えば:「コンピューター分子生物学」、Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988;「バイオコンピューティング:インフォーマティクスとゲノムプロジェクト」、Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993;「配列データのコンピューター解析、第一部」、Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994;「分子生物学における配列分析」、von Heinje, G., Academic Press, 1987;および「配列分析プライマー」、Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073、を参照)。配列同一性により、保存されたアミノ酸の数が標準的なアライメントアルゴリズムプログラムで決定され、それぞれの提供者により確立されているデフォルトギャップペナルティーと共に使用される。実質的に相同な核酸分子は、核酸の全長に沿って、もしくは興味のある完全長核酸分子の少なくとも約70%、80%もしくは90%に沿って、典型的に中度のストリンジェンシーもしくは高度のストリンジェンシーでハイブリダイズするであろう。また、ハイブリダイズする核酸分子中のコドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子が意図される。

10

【0081】

任意の二つの核酸分子が、少なくとも、例えば、80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%で''同一''であるクレオチド配列を有するか否かは、例えば、Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444のデフォルトパラメータを用いる''FAST A''プログラムのような既知のコンピューターアルゴリズムを使用して決定することができる。(他のプログラムとしては、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(I):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990);「巨大コンピューターへの入門」、Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073が挙げられる)。例えば、National Center for Biotechnology InformationデータベースのBLAST関数を用いて、同一性を測定することができる。他の市販もしくは公けに入手可能なプログラムとしては、DNASTar "MegAlign" プログラム (Madison, WI) および University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG)の "Gap" プログラム (Madison WI))が挙げられる。

20

【0082】

タンパク質および／もしくは核酸分子の相同性または同一性のパーセントを、例えば、GAPコンピュータープログラムを使用して配列情報を比較することにより測定することができる(例えば、Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443のSmith and Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482による改良)。略述すれば、GAPプログラムは、同一性を整列した類似のシンボル(即ち、ヌクレオチドもしくはアミノ酸)の数を二つの配列のうち短い方のシンボルの総数で割った値として定義する。GAPプログラムのデフォルトパラメータとしては、(1)単一比較マトリックス(同一の場合1、非同ーの場合0の値を含む)およびSchwartz and Dayhoff, eds.,「タンパク質配列および構造アトラス」、National Biomedical Research Foundation, pp. 353358 (1979)に記載されているような、Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745の重みつき比較マトリックス;(2)それぞれのギャップあたり3.0のペナルティーおよびそれぞれのギャップ中のそれぞれのシンボルにつきさらに別な0.1のペナルティー;ならびに(3)エンドギャップにはペナルティーなし、が挙げられ得る。それ故に、本明細書において使用されるように、用語''同一性''とは、試験および参照ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド間の比較を表す。

30

40

【0083】

本明細書において使用されるように、用語の少なくとも''90%同一''とは、参照ポリペプチドと比べて90~99.99%のパーセント同一性を指す。90%以上のレベルでの同一性とは、例示的目的のために100アミノ酸長の試験および参照ポリヌクレオチドを比較したと仮定して、試験ポリペプチドのアミノ酸の10%(即ち100個のうちの10

50

個)以下が参照ポリペプチドのアミノ酸と異なるという事実を示している。同様の比較を試験および参照ポリヌクレオチド間で行うことができる。そのような差は、アミノ酸配列の全長に沿ってランダムに分布している点突然変異として表されるか、またはそれらは最大許容可能な、例えば、10/100個のアミノ酸の差(約90%同一性)までの種々の長さの一つもしくはそれ以上の位置にクラスターを形成することができる。差はヌクレオチドもしくはアミノ酸の置換もしくは欠失として定義される。約85~90%以上の相同性もしくは同一性のレベルでは、結果はプログラムもしくは設定されたギャップパラメータには無関係のはずである；そのような高レベルの同一性は容易に、しばしばソフトウェアに依存することなく、評価されることができる。

【0084】

10

本明細書において使用されるように、プライマーとは、それからプライマー伸長産物の合成が開始され得る、二つもしくはそれ以上、典型的には4個以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを指す。合成を助長する実験条件としては、ヌクレオシド三リン酸、DNAポリメラーゼのような重合および伸長用の剤、ならびに適当な緩衝液、温度およびpHの存在が挙げられる。

【0085】

本明細書において使用されるように、動物としては、ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジ、げっ歯類、ブタおよびヒトのような任意の動物が挙げられるが、それらに限定されない。非ヒト動物は、意図される動物としてヒトを除外する。本明細書において提供されるSPは、任意の供給源、動物、植物、原核生物および真菌由来である。殆どのMTSP9は、哺乳動物起源を含めて、動物起源である。

20

【0086】

本明細書において使用されるように、遺伝子治療は、DNAのような異種の核酸の、そのような治療が求められている障害もしくは異状を有する動物、特にヒトの特定の細胞、標的細胞への移入を伴う。DNAのような核酸を、DNAのような異種核酸が発現されて、それによりコード化される治療用産物が生産されるような様式で、選択された標的細胞内に導入する。これに代えて、DNAのような異種タンパク質は、治療用産物をコード化するDNAの発現を或る様式で仲介し得るか、または治療用産物の発現を直接もしくは間接に或る様式で仲介するペプチドまたはRNAのような生産物をコード化し得る。遺伝子治療をまた用いて、欠陥遺伝子に置き換わるか、もしくはそれが導入された哺乳動物または細胞により生産される遺伝子産物を補充する遺伝子産物をコード化する核酸を送達することができる。導入された核酸は、哺乳動物宿主では通常生産されないかまたは治療的に有効な量でもしくは治療的に有用な時期に生産されないところの、その増殖因子阻害剤、または腫瘍壊死因子もしくはその受容体のようなその阻害剤のような、治療用化合物をコード化することができる。治療用産物をコード化するDNAのような異種核酸は、生産物もしくはその発現を促進するかまたはさもなければ変化させるために、罹患宿主の細胞中への導入に先立って修飾され得る。遺伝子治療はまた、遺伝子発現の阻害剤もしくはリプレッサーまたは他のモジュレーターを送達を伴うことができる。

30

【0087】

本明細書において使用されるように、異種の核酸とは、それが発現される細胞により通常はインビボで生産されないかまたは転写、翻訳、もしくは他の調節可能な生化学的プロセスに影響を及ぼすことにより、DNAのような内在性核酸の発現を変化させる仲介因子を仲介もしくはコード化するところの、核酸(DNAがRNAをコード化するならば)およびタンパク質である。DNAのような異種核酸はまた、DNAのような外来性核酸と称される。それが発現される細胞にとって異種もしくは外来性であると当業者が認識もしくは考える、DNAのような任意の核酸は、本明細書において異種性核酸に包含される；異種性核酸は、また内在的に発現されているところの外来性に添加された核酸を含む。

40

【0088】

異種性核酸の例としては、剤耐性を付与するタンパク質のような追跡可能なマーカータンパク質をコード化する核酸、抗がん剤、酵素およびホルモンのような治療的に有効な物質

50

をコード化する核酸、ならびに抗体のような他のタイプのタンパク質をコード化するDNAのような核酸、が挙げられるが、これらに限定されない。異種核酸によりコード化される抗体は、異種核酸が導入された細胞の表面に分泌もしくは発現させることができる。異種核酸は一般的に、それが導入される細胞にとって内在性でないが、さらに別な細胞から得られているかもしくは合成的に調製されているかである。必須ではないが一般的に、そのような核酸は、それが発現される細胞により通常は生産されない、RNAおよびタンパク質をコード化する。

【0089】

本明細書において使用されるように、治療的に有効な生産物は、異種核酸、典型的にはDNA、によりコード化される生産物であり、核酸が宿主に導入されると、遺伝性もしくはは獲得性疾患の症状、発現を軽減もしくは消失させるかまたは疾患を治癒する生産物が発現される。

10

【0090】

本明細書において使用されるように、ポリペプチドが実質的にプロテアーゼドメインより成るとの記述は、ポリペプチドの唯一のSP部分がプロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分であることを意味する。ポリペプチドは任意におよび一般的にさらに別な非SP由来アミノ酸配列を含むであろう。

【0091】

本明細書において使用されるように、がんもしくは腫瘍の処置もしくは剤は、単独もしくは他の処置もしくは化合物との組合せで使用したときに、欠陥のある血管新生と関連する臨床症状もしくは診断マーカーを軽減し、減少し、改善し、予防するか、もしくは寛解の状態に置かまたは維持することのできる任意の治療レジメンおよび／または化合物を指す。

20

本明細書において使用されるように、ドメインとは、分子の他の部分とは構造的および／もしくは機能的に異なる、分子、例えばタンパク質またはコード化する核酸、の一部を指す。

【0092】

本明細書において使用されるように、プロテアーゼとは、タンパク質もしくはペプチドの加水分解を触媒する酵素を指す。それはチモーゲン型およびその活性化型を含む。明確にするために、プロテアーゼへの参照は全ての型を指し、特定の型は具体的に指定される。本明細書の目的には、プロテアーゼドメインは、SPタンパク質の単一および二本鎖型のプロテアーゼドメインを含む。MTSP9については、プロテアーゼドメインはまた、単一および二本鎖型のプロテアーゼドメインを含む。

30

【0093】

本明細書において使用されるように、核酸は、DNA、RNAおよびタンパク質核酸(PNA)を含むその類似体ならびにそれらの混合物を含む。核酸は単一鎖もしくは二重鎖であり得る。プローブもしくはプライマーに言及するとき、蛍光もしくは放射標識のような検出可能な標識で任意に標識された単鎖分子が意図される。そのような分子は典型的に、ライブラリーのプロービングもしくはプライミングにおいてそれらの標的が統計的にユニークであるかまたは低いコピー数(典型的に5未満、一般的に3未満)を持つような長さである。プローブおよびプライマーは、10、20、30、50、100個もしくはそれ以上の核酸の長さであり得る。

40

【0094】

本明細書において使用されるように、SPのフラグメントもしくは一部をコード化する核酸とは、SPの記述されたフラグメントもしくは一部のみをコード化し、SPの他の隣接する部分をコード化しない核酸を指す。

【0095】

本明細書において使用されるように、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、および他のシグナル配列のような、ヌクレオチドの調節ならびにエフェクター配列への異種核酸の機能し得るような連結とは、DNAのようなそのような核酸、およびヌク

50

レオチドのそのような配列との間の関係を指す。例えば、プロモーターへの異種DNAの機能し得るような連結とは、そのようなDNAの転写が読みとり枠内のDNAを特異的に認識し、結合し、転写するところのRNAポリメラーゼによりプロモーターから開始されるように、DNAとプロモーターとの間の物理的関係を指す。かくして、機能し得るように結合されたもしくは機能的に関連されたとは、DNAのような核酸の、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位、および他のシグナル配列のような、ヌクレオチドの調節およびエフェクター配列との機能的関係を指す。例えば、プロモーターへのDNAの機能し得るような結合とは、そのようなDNAの転写がDNAを特異的に認識し、結合し、転写するRNAポリメラーゼによりプロモーターから開始されるように、DNAとプロモーターとの間の物理的および機能的な関係を指す。発現および／もしくはインビトロ転写を至適化するために、クローンの5'非翻訳部分を除去し、付加しもしくは変化して、転写もしくは翻訳のレベルのどちらかで、発現を妨害しもしくは減少させ得る、余分な潜在的に不適切なさらに別の翻訳イニシエーション(即ち開始)コドンもしくは他の配列を除去することが必要であり得る。これに代えて、コンセンサスリボゾーム結合部位(例えば、Kozak J. Biol. Chem. 266:19867-19870 (1991)を参照)を開始コドンの直ぐ5'側に挿入して、発現を促進することができる。そのような修飾の望ましさ(もしくは必要性)を経験的に決定することができる。

10

【0096】

本明細書において使用されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドに関し、RNAの少なくとも一部に相補的な配列とは、RNAと一般的には中度ないし高度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズして、安定な二重鎖を形成することができるほど十分な相補性を有する配列を意味する；二重鎖SPアンチセンス核酸の場合には、二重らせんDNAの単鎖(即ち、dsRNA)をこのように試験することができるか、もしくは三重らせん形成をアッセイすることができる。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さに依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、より多くの塩基がSPをコード化するRNAとミスマッチして、それは安定な二重らせん(場合によっては、三重らせん)を含有しそしてなお形成することができる。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を測定する標準的な手順の使用によりミスマッチの耐容度を確かめることができる。

20

【0097】

本明細書の目的には、アミノ酸置換は、得られたタンパク質がプロテアーゼ活性を示す条件で、任意のSPおよびそのプロテアーゼドメイン中で行われ得る。意図されるアミノ酸置換は、タンパク質分解活性を消失させない、表1に示すような、保存的置換を含む。本明細書に説明するように、切断部位および他のそのような部位の除去のように、タンパク質の性質を変化させる置換がまた、意図される；そのような置換は一般的に非保存的であるが、当業者により容易に実施されることができる。

30

【0098】

アミノ酸の適当な保存的置換は、当業者に公知であり、得られる分子の生物活性、例えば酵素活性、を変化させることなく、一般的に行うことができる。一般に、ポリペプチドの非必須領域における1個のアミノ酸の置換は、実質的に生物活性を変化させない(例えば、Watson et al.、「遺伝子の分子生物学、第4版」、1987, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p.224,を参照)ことを当業者は認識している。SPの触媒的に活性なフラグメント、特に単鎖プロテアーゼ部分はまた定義内に含まれる。保存的アミノ酸置換は、例えば、以下の表1に示される置換にしたがって行われる。

40

【0099】

【表1】

表 1

もとの残基	保存置換
Ala (A)	Gly; Ser, Abu
Arg (R)	Lys, orn
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val; Met; Nle; Nva
Leu (L)	Ile; Val; Met; Nle; Nv
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile; NLe Val
Ornithine	Lys; Arg
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Nle; Nv

10

20

他の置換はまた、許容可能であって、経験によりもしくは既知の保存的置換にしたがって決定されることができる。

【0100】

本明細書において使用されるように、A b uは2-アミノ酪酸であり；O r nはオルニチンである。

本明細書において使用されるように、本明細書に現れる種々のアミノ酸配列中に出てくる場所のアミノ酸は、それらの周知の3文字もしくは1文字の略号にしたがって特定される。種々のDNAフラグメント中に出てくるところのヌクレオチドは、当分野において日常使用される標準的な1文字呼称を用いて呼称される。

30

【0101】

本明細書において使用されるように、本明細書に開示されるヌクレオチド配列に基づくプローブもしくはプライマーは、配列番号5のヌクレオチドの少なくとも10、14、典型的には少なくとも16個の連続的配列、および配列番号5のヌクレオチドの少なくとも30、50もしくは100個の連続的配列のプローブを含む。ユニークなハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーの長さは興味のあるゲノムの複雑さの関数である。

本明細書において使用されるように、特定の医薬組成物の投与による特定の障害の症状の軽減とは、組成物の投与に帰することのできるかもしくはそれと関連する、永続的もしくは一時的にせよ、持続的または一過性の任意の緩和を指す。

40

【0102】

本明細書において使用されるように、アンチセンスポリヌクレオチドとは、mRNAもしくは二重鎖DNAのセンス鎖に相補的なヌクレオチド塩基の合成的配列を指す。適切な条件下におけるセンスおよびアンチセンスポリヌクレオチドの混合は、両分子の結合、即ちハイブリダイゼーションに至る。これらのポリヌクレオチドがmRNAに結合(とハイブリダイズ)するときに、タンパク質合成(翻訳)の障害が起こる。これらのポリヌクレオチドが二重鎖DNAに結合するときに、RNA合成(転写)の障害が起こる。翻訳および／もしくは転写の得られた障害は、センス鎖によりコード化されたタンパク質の合成の障害に至る。アンチセンス核酸分子は典型的に、十分な数のヌクレオチドを含有して、標的核酸、少なくとも5個の隣接ヌクレオチド、しばしば、興味のある遺伝子をコード化する核酸分子、例えば、SPの単鎖プロテアーゼドメイン、をコード化する核酸のコード化部分に

50

相補的な少なくとも14もしくは16または30個の隣接する、ヌクレオチドもしくは修飾ヌクレオチドに特異的に結合する。

【0103】

本明細書において使用されるように、アレイとは、3個以上のメンバーを含む、抗体のような、要素の集まりを指す。アドレス可能なアレイは、典型的には固相支持体上の位置により、アレイのメンバーが確認し得るものである。したがって、一般にアレイのメンバーは、固相表面上の別々の確認し得る位置に固定化される。

【0104】

本明細書において使用されるように、抗体とは、天然または部分的にもしくは完全に合成的に調製されたものであれ、イムノグロブリンを指し、抗体の特異的結合能を保持しているその任意の誘導体も含む。したがって、抗体は、イムノグロブリンの結合ドメインと相同もしくは実質的に相同であるところの結合ドメインを有する任意のタンパク質を含む。抗体としては、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを含む、任意のイムノグロブリンクラスのメンバーが挙げられる。

10

【0105】

本明細書において使用されるように、抗体フラグメントとは、完全長の抗体の特異的結合能の少なくとも一部を保持している、完全長より短い抗体の任意の誘導体を指す。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab)₂、単鎖Fv(scFv)、Fv、dsFvディアボディーおよびFdフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。フラグメントは、ジスルフィド橋のように、互いに結合した複数の鎖を含むことができる。抗体フラグメントは一般的に、少なくとも約50個のアミノ酸、典型的には少なくとも200個のアミノ酸を含有する。

20

【0106】

本明細書において使用されるように、Fv抗体フラグメントは、非共有結合的相互作用で結合した一つの可変重鎖ドメイン(V_H)および一つの可変軽鎖ドメインより成る。

本明細書において使用されるように、dsFvとは、V_H-V_L対を安定化させる、工学的に操作された分子間ジスルフィド結合を持つFvを指す。

【0107】

本明細書において使用されるように、F(ab)₂フラグメントとは、イムノグロブリンをペプシンによりpH4.0~4.5で消化した結果得られる抗体フラグメントである；それは組換え的に発現させて、同等のフラグメントを生産することができる。

30

本明細書において使用されるように、Fabフラグメントはイムノグロブリンをパパインで消化した結果得られる抗体フラグメントである；それらを組換え的に発現させて、同等のフラグメントを生産することができる。

【0108】

本明細書において使用されるように、scFvとは、ポリペプチドリinkerにより任意の順序に連結された可変軽鎖(V_L)および可変重鎖(V_H)を含有する、抗体フラグメントを指す。リンカーは、2個の可変ドメインが実質的な妨害なしに架橋されるような長さを持つ。含まれるリンカーは、溶解性を増すために全体に亘って分散させた幾つかのGluもしくはLys残基を持つ(Gly-Ser)_n残基である。

40

【0109】

本明細書において使用されるように、ヒト化抗体とは、ヒトへの投与が免疫応答を惹起しないように、アミノ酸のヒト配列を含有するように修飾された抗体を指す。そのような抗体の調製方法は公知である。例えば、そのような抗体を生産するためには、モノクローナル抗体を発現する、ハイブリドーマまたはE. coliもしくはCHO細胞のような他の原核もしくは真核細胞を、組換えDNAテクニックにより変化させて、非可変領域のアミノ酸組成がヒト抗体に基づくところの抗体を発現させる。そのような領域を特定するためにコンピュータープログラムがデザインされている。

本明細書において使用されるように、ディアボディーは2量体のscFvである；ディアボディーは、典型的にscFvより短いペプチドリinkerを有して、それらは一般的に二

50

量体化する。

【0110】

本明細書において使用されるように、組換えDNA方法を用いる組換え手段による生産とは、クローン化DNAによりコード化されるタンパク質を発現するための分子生物学の周知の方法の使用を意味する。

本明細書において使用されるように、用語の評価とは、試料中に存在するSPもしくはそのドメインの活性の絶対値を得るという意味において、およびまた、活性レベルを示す、指標、比率、パーセンテージ、視覚的もしくは他の値を得るという意味において、定量的および定性的測定を含むものとする。評価は直接的でも間接的でもあり得て、そして実際に検出される化学種は、勿論タンパク質分解産物そのものである必要はないが、例えばその誘導体もしくは或るさらなる物質であり得る。

10

【0111】

本明細書において使用されるように、生物活性とは、化合物のインビボ活性、即ち化合物、組成物もしくは他の混合物のインビボ投与の結果として得られる生理学的応答を指す。かくして、生物活性は、そのような化合物、組成物および混合物の治療効果および薬学的活性を包含する。生物活性は、そのような活性を試験もしくは使用するようデザインされたインビトロシステムにおいて観察されることができる。かくして、本明細書の目的のためには、ルシフェラーゼの生物活性は、そのオキシゲナーゼ活性であり、それによって基質の酸化に際し光が生成される。

20

【0112】

本明細書において使用されるように、機能的活性とは、完全長タンパク質に関連する一つもしくはそれ以上の活性を示す、ポリペプチドまたはその一部を指す。機能的活性としては、生物活性、触媒もしくは酵素活性、抗原性(抗ポリペプチド抗体に結合するポリペプチドと結合するかもしくは競合する能力)、免疫原性、多量体形成能、ポリペプチドに対する受容体もしくはリガンドに特異的に結合する能力、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0113】

本明細書において使用されるように、結合体とは、MTSP9を含む一つもしくはそれ以上のSP、特にその単鎖プロテアーゼドメイン、および一つもしくはそれ以上のターゲティング剤を含む、本明細書において提供される化合物を指す。これらの結合体としては、組換え手段により融合タンパク質として生産されたもの、例えばスルフヒドリル基へのカップリングによる、化学的カップリングによるような化学的手段により生産されたもの、および任意の他の方法により生産されたものが挙げられるが、それによって少なくとも一つのSPもしくはそのドメインが、直接にもしくはリンカーを介して間接的に、ターゲティング剤に結合される。

30

【0114】

本明細書において使用されるように、ターゲティング剤は、結合体もしくはそのSP部分を細胞内に取り込むことができる細胞表面受容体への結合体の特異的結合を提供する、タンパク質またはその有効な部分のような、任意の部分である。ターゲティング剤はまた、例えば、結合体の親和性による単離もしくは精製；表面への結合体の付着；または結合体もしくは結合体を含む複合体の検出を促進するか容易にするものであり得る。

40

本明細書において使用されるように、抗体結合体とは、ターゲティング剤が抗体である結合体を指す。

本明細書において使用されるように、分子の誘導体もしくは類似体とは、分子から誘導された部分もしくは分子の修飾体を指す。

【0115】

本明細書において使用されるように、特定の疾患を処置するための化合物の有効量は、疾患に関連する症状を軽減するか何らかの様式で減少するのに十分な量である。そのような量は、有効であるならば、単回投与され得るかもしくはレジメンにしたがって投与され得る。その量は、疾患を治癒し得るが、典型的には、疾患の症状を軽減させるために投与さ

50

れる。症状の所望の軽減を達成するために反復投与が必要とされることがあり得る。

【0116】

本明細書において使用されるように、同等とは核酸の二つの配列へ言及するときは、問題の二つの配列が、アミノ酸もしくは同等なタンパク質の同じ配列をコード化することを意味する。二つのタンパク質もしくはペプチドに言及する際に同等を用いるときには、それは二つのタンパク質もしくはペプチドが、タンパク質もしくはペプチドの活性または機能を実質的に変化させない、アミノ酸置換のみ(これらに限定されないが上述の表1に示したような保存的变化のような)を持つ実質的に同じアミノ酸配列を有することを意味する。性質について同等を言及するときには、性質は同程度に存在する必要はない(例えば、二つのペプチドは同じタイプの酵素活性の異なる速度を示し得る)が、活性は通常は、実質的に同じである。相補性は、二つのヌクレオチドについて言及するときには、二つのヌクレオチドの配列がハイブリダイズする能力があって、相対するヌクレオチド間に典型的には25%、15%、5%もしくは0%のミスマッチを持つことを意味する。必要があるならば、相補性のパーセンテージが特定されるであろう。典型的には、二つの分子は、それらが高度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするであろうように選択される。

10

【0117】

本明細書において使用されるように、タンパク質の活性または遺伝子もしくは核酸の発現を調整する剤は、タンパク質の活性を、減少させもしくは増加させるかまたはさもなければ変化させるか、または細胞中の核酸の発現を何らかの様式で上方もしくは下方制御するかまたはさもなければ変化させる。

20

【0118】

本明細書において使用されるように、SP活性の阻害剤は、SPの生産、翻訳後修飾(複数を含む)、成熟、もしくは膜局在化を阻害する任意の物質、または、特にインビトロスクリーニングアッセイにおいて単鎖型の、そのタンパク質分解効率を妨害もしくは減少させる任意の物質を包含する。

【0119】

本明細書において使用されるように、新生物形成性疾患の処置もしくは予防する方法とは、腫瘍、その転移、腫瘍の血管新生のような任意の症状、または疾患が特徴づけられる他のパラメータが減少され、改善され、予防され、寛解の状態に置かれるかもしくは寛解の状態に維持されることを意味する。それはまた、新生物形成性疾患および転移の特質を、処置により消失し、減少もしくは予防し得ることを意味する。特質の非限定的例としては、基底膜および近接部位の細胞外マトリックスの制御されない分解、内皮細胞の移動、分裂、および組織化による新しい機能性毛細管の生成、およびそのような機能性毛細管の存続が挙げられる。

30

【0120】

本明細書において使用されるように、結合体の薬学的に許容される塩、エステルもしくは他の誘導体としては、そのような誘導体化の公知の方法を用いて当業者により容易に調製することができて、実質的な毒性作用なしに動物もしくはヒトに投与可能な化合物を生産し、そして薬学的に活性であるかしくはプロドラッグであるところの任意の塩、エステルもしくは誘導体が挙げられる。

40

【0121】

本明細書において使用されるように、プロドラッグは、インビボでの投与により化合物の生物学的に、薬学的に、もしくは治療的に活性な型に代謝されるかまたはさもなければ変換されるところの化合物である。プロドラッグを生産するためには、活性な化合物が代謝的なプロセスにより再生されるように、薬学的に活性な化合物を修飾する。プロドラッグは、剤の代謝安定性もしくは輸送特性を変化させるように、副作用もしくは毒性をマスクするように、剤の風味を改善するように、または剤の他の特色もしくは性質を変えらるるようデザインされることができる。インビボでの薬物動態学的プロセスおよび薬物代謝の知識のお陰で、一旦薬学的に活性な化合物が知られれば、当業者は化合物のプロドラッ

50

グをデザインすることができる(例えば、Nograpy (1985)、「メディシナルケミストリー 生化学的アプローチ」、Oxford University Press, New York, pages 388-392、を参照)。

【0122】

本明細書において使用されるように、本明細書において提供されるスクリーニング方法により同定される薬物とは、治療薬としてもしくは治療薬のデザイン用のリード化合物としての使用の候補である、任意の化合物を指す。そのような化合物は、有機低分子、ペプチド、ペプチドミメティック、アンチセンス分子もしくはRNAiのようなdsRNA、抗体、抗体のフラグメント、組換え抗体、および薬物候補もしくはリード化合物として役立ち得る他のそのような化合物を含む、低分子であり得る。

10

【0123】

本明細書において使用されるように、ペプチドミメティックは、生物学的に活性な型の特定のペプチドのコンフォーメーションおよび特定の立体化学的特徴を模倣する化合物である。一般に、ペプチドミメティックは化合物の特定の所望の性質を模倣するが、生物学的に活性なコンフォーメーションの消失および結合の破壊に導く柔軟性のような望ましくない性質を模倣しないようにデザインされる。ペプチドミメティックは、生物学的に活性な化合物から、望ましくない性質を有する特定の基もしくは結合を生物学的等価物に置換することにより調製され得る。生物学的等価物は当業者に公知である。例えば、メチレン系生物学的等価物であるCH₂Sはエンケファリン類似体中のアミドの置換に使用されてきた(例えば、Spatola (1983) pp. 267-357、「アミノ酸、ペプチド、およびタンパク質の化学と生化学」、Weinstein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York、を参照)。経口的に投与され得るモルヒネは、ペプチドであるエンドルフィンのペプチドミメティックである。本明細書の目的には、環状ペプチドはペプチドミメティックの中に含まれる。

20

【0124】

本明細書において使用されるように、プロモーター領域もしくはプロモーター要素とは、それが機能し得るように結合しているDNAもしくはRNAの転写を制御する、DNAまたはRNAのセグメントを指す。プロモーター領域は、RNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始に十分である特定の配列を含む。プロモーター領域のこの部分をプロモーターと呼称する。加えて、プロモーター領域は、RNAポリメラーゼのこの認識、結合および転写開始活性を調整する配列を含む。これらの配列はシスに作用し得るかもしくはトランス作用因子に応答し得る。プロモーターは、調節の性質に依存して、構成的もしくは調節性であり得る。原核生物で使用されるための例示的に意図されるプロモーターとしては、バクテリオファージのT7およびT3プロモーターが挙げられる。

30

【0125】

本明細書において使用されるように、受容体とは、与えられたリガンドに親和性を有する分子を指す。受容体は天然に存在するかもしくは合成的な分子であり得る。受容体は、当分野において抗リガンドとも呼称される。本明細書において使用されるように、受容体および抗リガンドは互換可能である。受容体を、その変更されていない状態でもしくは他の種との凝集体として使用することができる。受容体を、結合メンバーに直接的にまたは特定の結合物質もしくはリンカーを介して間接的に、共有結合的もしくは非共有結合的に付着させ、または物理的に接触させることができる。受容体の例としては、抗体、細胞膜受容体、表面受容体および内部移行性受容体、特定の抗原決定基「ウイルス、細胞もしくは他の物質上にあるような」と反応するモノクローナル抗体および抗血清、薬物、ポリヌクレオチド、核酸、ペプチド、補因子、レクチン、糖、多糖類、細胞、細胞膜、およびオルガネラが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0126】

受容体およびそのような受容体を用いた応用の例としては、

a) 酵素：抗生物質「リガンド」選択の標的として役立ち得る、微生物の生存に必須の特定の輸送タンパク質もしくは酵素；

b) 抗体：興味のある抗原のエピトープと結合する抗体分子上のリガンド結合部位の同定

50

を研究することができる；抗原エピトープを模倣する配列の決定は、免疫原が一つもしくはそれ以上のそのような配列に基づくワクチンの開発に至るかまたはは関連診断剤の開発もしくはは自己免疫疾患のためのような治療的処置に有用な化合物の開発に至ることができる；

c)核酸：部位に結合する、タンパク質もしくはRNAのような、リガンドの同定；

d)触媒性ポリペプチド：一つもしくはそれ以上の反応物質の一つもしくはそれ以上の生産物への変換に関与する化学反応を促進する能力があるところのポリペプチドを含むポリマー；そのようなポリペプチドは一般的に、少なくとも1個の反応物質もしくは反応中間物に特異的な結合部位および結合部位に近接して活性な機能部位を含有しており、そこでは機能性は、結合した反応物質を化学的に修飾する能力がある(例えば、米国特許第5,215,899号、を参照)；

e)ホルモン受容体：受容体に高親和性で結合するリガンドの測定は、ホルモン代替療法の開発に有用である；例えば、そのような受容体に結合するリガンドの同定は、血圧を制御するための薬物の開発に至り得る；ならびに

f)オピエート受容体：脳中でオピエート受容体に結合するリガンドの測定は、モルヒネおよび関連薬に代わるより耽溺性の少ない代替物の開発に有用である；
が挙げられるが、それらに限定されない。

【0127】

本明細書において使用されるように、試料とは、アナライトのアッセイが望まれているアナライトを含有し得る任意のものを指す。試料は、生物学的流動体もしくは生物学的組織のような生物学的試料であり得る。生物学的流動体の例としては、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、糞、痰、脳脊髄液、涙、粘液、精液、羊水等が挙げられる。生物学的組織は、通常は、結合の、上皮の、筋肉のおよび神経の組織を含む、ヒト、動物、植物、細菌、真菌、もしくはウイルスの構造の構造物質の一つを形成するそれらの細胞間物質と一緒にになった特定の種類の細胞の凝集物である。生物学的組織の例としてはまた、器官、腫瘍、リンパ節、動脈および個々の細胞が挙げられる。

【0128】

本明細書において使用されるように、ミスマッチのパーセンテージの測定におけるハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは次の通りである。

1)高度のストリンジェンシー：0.1×SSPE、0.1%SDS、65℃

2)中度のストリンジェンシー：0.2×SSPE、0.1%SDS、50℃

3)程度のストリンジェンシー：1.0×SSPE、0.1%SDS、50℃

【0129】

当業者は、洗浄段階が安定なハイブリッドを選択することを知り、そしてSSPEの成分を知っている(例えば、「分子クローニング：実験室マニュアル」中の、Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), vol. 3, p. B.13、を参照、また、通常に使用される実験室用溶液を記載する多数のカatalog、を参照)。SSPEは、pH7.4のリン酸緩衝0.18M NaClである。さらに、当業者はハイブリッドの安定性はT_mによって測定されることを認識するが、これはイオン濃度と温度の関数であるので(T_m = 81.5度 - 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(%G+C) - 600/l))、洗浄条件においてハイブリッドの安定性に決定的に重要な単なるパラメータは、SSPE(もしくはSSC)中のナトリウムイオン濃度と温度である。

【0130】

さらに別な緩衝液、塩および温度を用いて、同等のストリンジェンシーを達成し得ることは理解されている。例として、限定しないで、低度のストリンジェンシー条件を使用する手順は次の通りである(Shilo and Weinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792 (1981)、をまた参照)：DNAを含有するフィルターを、35%ホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM EDTA、0.1%PVP、0.1%Ficoll、1%BSA、および500μg/mlの変性サケ精子DNA(10×SSCは、1.5M塩化ナトリウムおよび0.15Mクエン酸ナトリウムをpH7に調整)を含有

する溶液中で、40℃で6時間前処理する。

【0131】

ハイブリダイゼーションは以下の修正を行った同じ溶液で行う：0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサケ精子DNA、10% (wt/vol) 硫酸デキストラン、および $5 \sim 20 \times 10^6 \text{ cpm}$ ^{32}P -標識プローブを用いる。フィルターを、ハイブリダイゼーション用混液中40℃で18～20時間インキュベートして、次いで $2 \times \text{SSC}$ 、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTA、および0.1% SDSを含有する溶液中55℃で1.5時間洗浄する。洗浄液を新しい液に代えて、60℃でさらに1.5時間インキュベートする。フィルターを吸い取り紙で乾かして、オートラジオグラフィーに曝露する。必要ならば、フィルターを65～68℃で3回目の洗浄を行って、再びフィルムに曝露する。使用できる低度のストリンジエンシーの他の条件は当分野において周知である(例えば、種間ハイブリダイゼーションに使用されるように)。

【0132】

例として、限定しないで、中度のストリンジエンシー条件を使用する手順としては、例えば、次のような中度のストリンジエンシー条件を使用する手順が挙げられるが、これに限定されない：DNAを含有するフィルターを、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times \text{Denhart}$ 溶液、0.5% SDSおよび100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子DNAを含有する溶液中で、55℃で6時間前処理する。ハイブリダイゼーションを同じ溶液中で行い、 $5 \sim 20 \times 10^6 \text{ cpm}$ ^{32}P -標識プローブを使用する。フィルターをハイブリダイゼーション混液中に55℃で18～20時間インキュベートし、次いで $1 \times \text{SSC}$ および0.1% SDSを含有する溶液中で、60℃で30分2回洗浄する。フィルターを吸い取り紙で乾かして、オートラジオグラフィーに曝露する。使用され得る他の中度のストリンジエンシー条件は当分野において周知である。フィルターの洗浄を、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDSを含有する溶液中で、37℃で1時間行う。

【0133】

例として、限定しないで、高度のストリンジエンシー条件を使用する手順は以下の通りである：DNAを含有するフィルターのプレハイブリダイゼーションを、 $6 \times \text{SSC}$ 、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子DNAから成る緩衝液中で、65℃で8時間～一夜の間行う。フィルターを、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性サケ精子DNAおよび $5 \sim 20 \times 10^6 \text{ cpm}$ の ^{32}P -標識プローブを含有するプレハイブリダイゼーション混液中で、65℃で48時間ハイブリダイズさせる。フィルターの洗浄を、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.01% PVP、0.01% Ficollおよび0.01% BSAを含有する溶液中で、37℃で1時間行う。これに引き続いて $0.1 \times \text{SSC}$ 中で50℃で45分間洗浄の後、オートラジオグラフィーを行う。使用できる他の高度のストリンジエンシー条件は当分野において周知である。

【0134】

実質的同一または実質的に相同もしくは類似という用語は当業者により理解されているように文脈によって異なり、一般的には、少なくとも60%もしくは70%の同一性を意味し、好ましくは少なくとも80%、85%もしくはさらに好ましくは少なくとも90%の同一性を意味し、最も好ましくは少なくとも95%の同一性を意味する。本明細書において使用されるように、生産物と実質的に同一とは、興味のある性質が十分に不変のままであるように、実質的に同一な生産物が生産物の代わりに使用し得るように、十分に類似していることを意味する。

【0135】

本明細書において使用されるように、実質的に純粋とは、そのような純度の評価に当業者が使用する薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動、および高速液体クロマトグラフィーのような、標準的な分析方法で容易に検出可能な不純物を含まないように見えるほど十分に均一であること、もしくはさらなる精製が物質の酵素及び生物活性のような物

理的及び化学的性質を検出できるほどには変化させないと思われるほど十分純粋であること、を意味する。実質的に化学的に純粋な化合物を生産するための化合物の精製方法は当業者に周知である。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は、立体異性体もしくは異性体の混合物であり得る。そのような場合には、さらなる精製は化合物の比活性を増加させるであろう。

本明細書において使用されるように、標的細胞とは、インビボでS Pを発現する細胞を指す。

【0136】

本明細書において使用されるように、試験物質(もしくは試験化合物)とは、S P、特にプロテアーゼドメインもしくはその十分な部分を含む単鎖型、に対するその作用が本明細書において提供されるアッセイのようなインビトロ法により測定されるところの、化学的に規定された化合物(例えば有機分子、無機分子、有機／無機分子、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、多糖類、糖類、もしくは糖タンパク質のようなこれらの分子のハイブリッド、等)または化合物の混合物(例えば試験化合物のライブラリー、天然抽出物、もしくは培養上清、等)を指す。

10

【0137】

本明細書において使用されるように、用語の治療薬、治療レジメン、放射線防護剤および化学療法剤とは、当業者に周知である、ワクチンを含む、従来の薬物および薬物療法を意味する。放射線治療剤は当分野において周知である。

本明細書において使用されるように、処置とは、異常、障害もしくは疾患の症状が軽減されるかまたはさもなければ有益なように変化される、任意の様式を意味する。処置はまた、本明細書における成分の任意の薬学的使用を包含する。

20

【0138】

本明細書において使用されるように、ベクター(もしくはプラスミド)とは、異種核酸をその発現もしくは複製のどちらかのために細胞内に導入するために使用される個別的な要素を指す。ベクターは典型的には、エピゾームのままであるが、ゲノムの染色体内に遺伝子もしくはその一部を組み込ませるようにデザインされることもできる。酵母の人工染色体および哺乳動物の人工染色体のような人工染色体である、ベクターもまた意図される。そのようなベクターの選択および使用は当業者に周知である。発現ベクターとしては、そのようなDNAフラグメントの発現を効果的にする能力があるところのプロモーター領域のような、調節配列に機能し得るように結合されたDNAを発現する能力のあるベクターが挙げられる。かくして、発現ベクターとは、適切な宿主細胞の中への導入に際して、クローニングDNAの発現をもたらすところのプラスミド、ファージ、組換えウイルスもしくは他のベクターのような、組換えDNAまたはRNA構築物を指す。適切な発現ベクターは当業者に周知であって、真核細胞および／もしくは原核細胞において複製可能であるものならびにエピゾームのままであるもの、または宿主のゲノム内に組み込まれるものが挙げられる。

30

【0139】

本明細書において使用されるように、タンパク質結合配列とは、他のタンパク質もしくはペプチド配列に一般的に、特定のセットのタンパク質もしくはペプチド配列に、または特定のタンパク質もしくはペプチド配列に、特異的に結合する能力のあるタンパク質またはペプチド配列を指す。

40

【0140】

本明細書において使用されるように、エピトープタグとは、エピトープタグを付けたタンパク質もしくはペプチドの以後の生物学的および免疫学的分析を容易にするための、エピトープに相当するアミノ酸残基の短い一続きを指す。エピトープタグgingは、エピトープタグの配列を適切な発現ベクター中のタンパク質コード化配列に含ませることにより達成される。エピトープタグを付けたタンパク質は、タグに対して育成した高度に特異的な抗体を用いてアフィニティー精製されることができる。

本明細書において使用されるように、金属結合配列とは、金属イオンに一般的に、特定の

50

セットの金属イオンに、もしくは特定の金属イオン、に特異的に結合する能力のある、タンパク質またはペプチド配列を指す。

【0141】

本明細書において使用されるように、組合せとは、二つの間もしくはさらに多くの品目の間の任意の集まりを指す。

本明細書において使用されるように、組成物とは、任意の混合物を指す。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、糊状物、水溶液、非水溶液、もしくはそれらの任意の組合せであり得る。

【0142】

本明細書において使用されるように、流動体とは、流れることのできる任意の組成物を指す。かくして、流動体は、半固形物、糊状物、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリーム、および他のそのような組成物を包含する。

本明細書において使用されるように、細胞抽出物とは、溶解もしくは破壊した細胞から作製された調製物もしくはフラクションを指す。

【0143】

本明細書において使用されるように、剤が、タンパク質単独もしくはその会合した基質、結合相手、等と一緒にの会合に関与する特定の配列を考慮することなくランダムに選択されたときには、剤はランダムに選択されたと言われる。ランダムに選択された剤の例は、ケミカルライブラリーもしくはペプチドのコンビナトリアルライブラリー、または生物の培養液もしくは馴化培地の使用である。

【0144】

本明細書において使用されるように、剤の作用との関連で標的部位の配列および／もしくはそのコンフォーメーションを考慮に入れる、非ランダム基準で剤が選択されるときには、剤は合理的に選択されるもしくはデザインされると言われる。実施例に記載されるように、配列番号3もしくは配列番号4を有するタンパク質中にセリンプロテアーゼに対する提案された結合部位および(触媒)部位が存在する。剤は、これらの部位を作り上げているペプチド配列を利用することにより合理的に選択されるかもしくは合理的にデザインされ得る。例えば、合理的に選択されたペプチド剤は、そのアミノ酸配列がドメインのA T Pもしくはカルモジュリン結合部位と同一である、ペプチドであり得る。

開示を明確にするために、限定という目的ではなく、詳細な説明を以下のサブセクションに分類する。

【0145】

B. M T S P 9 ポリペプチド、その突然変異タンパク質、誘導体および類似体
M T S P

M T S P は、哺乳動物およびまた他の動物種にも見出される、膜貫通型セリンプロテアーゼのファミリーである。M T S P は、それらが腫瘍細胞中で通常細胞中とは異なるレベルで発現および／もしくは活性化されているか、または腫瘍細胞中で正常細胞中とは、その基質、または補助因子もしくは受容体の変化によるように異なる、機能活性を有しているらしいために、興味深い。

【0146】

M T S P は、タンパク質分解活性を有する細胞外C末端ドメイン；N末端近くに疎水性ドメインを持つ膜貫通ドメイン；短い細胞質内ドメイン；およびさらに別なモジュラードメインを含有し得る、異なる長さの幹領域：を含む多数の共通の構造的特徴を共有する。タンパク質分解活性ドメインは、保存されているモチーフ中に存在する、触媒活性に必要な保存されたH i s、A s p、およびS e r 残基を含む配列ホモロジーを共有している。M T S P は通常、チモーゲンとして合成されて、切断により2本鎖型に活性化されることができる。単鎖タンパク質分解活性ドメインがインビトロで機能することができ、したがってこのファミリーのメンバーの活性を調節する、剤を同定するためのインビトロアッセイに有用であることが、本明細書において示される。

【0147】

10

20

30

40

50

本明細書における目的には、MTSPのプロテアーゼドメインは、2本鎖活性化生成物を生産する活性化切断によりもたらされる必要はなくて、むしろ単鎖ポリペプチドを含み、そこではN-末端としては、コンセンサス配列（下矢）VVGG、（下矢）IVGG、（下矢）VGLL、（下矢）ILGG、（下矢）IVQGもしくは（下矢）IVNG（下矢）IASGまたは他のそのようなモチーフが挙げられる。そのようなポリペプチドは、活性化切断の結果ではなくそして2本鎖型ではないが、タンパク質分解(触媒)活性を示す。これらのプロテアーゼドメインポリペプチドをアッセイに使用して、MTSP9の活性を調節する剤をスクリーニングする。

【0148】

MTSPファミリーは治療的介入のための標的であり、そして或るメンバーはまた、腫瘍発生、成長および／もしくは進行の診断マーカーとして役立つことができる。議論したように、このファミリーのメンバーは、腫瘍発生、成長および／もしくは進行に関係している、タンパク質分解過程に関与している。この関係は、ECMの分解および／もしくはリモデリング、ならびに増殖因子前駆体、プロホルモンもしくは血管新生性化合物前駆体の活性化に関連した過程におけるタンパク質分解酵素としてのそれらの機能に基づいている。加えて、それらの発現のレベルもしくは活性化のレベルまたは基質レベル、もしくは基質およびそのレベルの変化によりもたらされるそれらの見かけの活性は、同一組織中の腫瘍細胞および非腫瘍細胞で異なる。同様に、これらのプロテアーゼの補助因子もしくは受容体のレベルは、腫瘍および非腫瘍細胞間で異なり得る。したがって、それらのタンパク質分解活性およびシグナル伝達のようなそれらの活性、ならびに／またはそれらの活性および／もしくは発現を調整する化合物とそれらを接触させることによるような、それらの発現を変化させるプロトコールおよび処置は、腫瘍発生、成長および／もしくは進行に影響を及ぼすことができであろう。また、或る場合には、活性化および／もしくは発現のレベルは、肺癌、結腸腺癌ならびに卵巣癌のような腫瘍において変化し得る。

【0149】

MTSP9

MTSP9は、それが腫瘍細胞中で発現されるかもしくは活性であるため興味深い。本明細書において提供されるMTSPは、新生物形成性疾患を有しない単数もしくは複数の対象と比較しての、新生物形成性疾患を持つ対象(即ち哺乳動物、特にヒト)における活性および／または発現もしくは機能のレベルのお陰で、特定の腫瘍の診断マーカーとして役立つことができる。加えて、特定の組織における活性(および／もしくは発現)の検出は、新生物形成性疾患を示し得る。本明細書において提供されるMTSP9は、特定の腫瘍において発現および／もしくは活性化されている；したがってそれらの活性化もしくは発現は腫瘍の発生、成長および／もしくは進行の診断マーカーとして役立つことができることが、本明細書において示される。他の場合には、MTSPポリヌクレオチドは、補助因子、基質もしくは受容体の活性もしくは発現の変化のお陰で変化した活性を示すことができる。加えて、いくつかの場合には、これらのMTSPおよび／もしくはその突然変異体は細胞表面から脱落することができる。血清、血液、唾液、脳脊髄液、滑液および間質液、尿、汗ならびに他のそのような流動体および分泌物のような体液中の、脱落したMTSP、特に細胞外プロテアーゼドメイン、の検出は、診断用腫瘍マーカーとして役立つことができる。特に、任意の新生物形成性疾患をも有していないことが知られている対象と比較して、もしくは同一対象の初期のサンプルと比較して、対象中のそのような脱落ポリペプチドのより高いレベルの検出は、対象における新生物形成性疾患を示し得る。

【0150】

ポリペプチドおよび突然変異タンパク質

MTSP9のプロテアーゼドメインを含有する、単離された、実質的に純粋な単鎖および2本鎖ポリペプチドが、本明細書において提供される。ポリペプチドはまた、アミノ酸の他の非MTSP配列を含有することができるが、本明細書において提供される任意のような、そのようなプロテアーゼ活性を評価する任意のインビトロアッセイにおいて触媒活性を示すために、プロテアーゼドメインもしくはその充分な部分を含む。

本明細書において提供されるM T S P 9は、典型的にはそれらが同じタイプの非腫瘍細胞において発現もしくは活性化されるレベルとは異なったレベルで、腫瘍細胞によりもしくはその中で発現または活性化される。したがって、例えば、もしM T S Pが子宮頸部腫瘍において発現しているならば、それは非腫瘍子宮頸部細胞におけるものとは異なるレベルで発現しているかもしくは活性である。M T P S 9の発現もしくは活性化は子宮頸部、肺、食道、結腸、前立腺、子宮、膵臓、乳房および他の腫瘍を示し得る。

【0151】

プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分を含む、単離された、実質的に純粋なプロテアーゼが提供される。M T S P 9の単鎖型および2本鎖型が提供される。プロテアーゼドメインはさらに長いタンパク質に含有されることができて、そのようなさらに長いタンパク質は、任意にM T S P 9チモーゲンである。例示的なM T S P 9コード化核酸およびプロテアーゼドメインのタンパク質配列は、配列番号5および6に示され、そして完全長タンパク質およびコード化する核酸の配列は配列番号18および17に示される。かくして、M T S P 9ポリペプチドは、配列番号6、16もしくは18に示されるアミノ酸配列を含む。プロテアーゼ活性を保持するそのより小さいタンパク質が意図される。そのプロテアーゼドメインは配列番号16に示される。

10

【0152】

実質的に精製されたM T S P 9は、配列番号5もしくは17のいずれに示されるヌクレオチド配列によりコード化されるプロテアーゼドメインを含有する核酸分子と、そのプロテアーゼドメインをコード化する核酸がその全長、または完全長の少なくとも70%、80%もしくは90%に沿ってハイブリダイズするような、少なくとも中等度の、一般的には高度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするところの核酸によりコード化される。特定の実施態様では、実質的に精製されたM T S P プロテアーゼは、配列番号6もしくは18に示されるアミノ酸配列またはそのプロテアーゼドメイン部分、またはその触媒的に活性な部分を実質的に含むところの単鎖ポリペプチドである。

20

【0153】

また、実質的に精製されたM T S P 9チモーゲン、活性化された2本鎖型、単鎖プロテアーゼドメインおよび2本鎖プロテアーゼドメインが含まれる。これらのポリペプチドは、タンパク質分解酵素活性を示すプロテアーゼドメインをコード化する配列を含むところの、そして配列番号5もしくは7に示されるヌクレオチド配列を有する核酸分子と、典型的には中等度の、一般的には高度のストリンジェンシー下で、そして一般的には完全長に沿って、もしくはプロテアーゼドメインの完全長の少なくとも約70%、80%もしくは90%(もしくは実質的に完全長)に沿ってハイブリダイズするところの、核酸によりコード化される。スプライスバリエーションもまた、本明細書において意図される。

30

【0154】

プロテアーゼドメイン

M T S P プロテアーゼドメインとしては、M T S P 9の単鎖プロテアーゼドメインが挙げられる。任意のM T S P、特にM T S P 9のプロテアーゼドメインである、M T S Pの部分を含むところのプロテアーゼドメインもしくはタンパク質が、提供される。タンパク質はまた、アミノ酸の他の非M T S P配列をも含むことができるが、本明細書において提供される任意のような、そのようなプロテアーゼ活性を評価する任意のインビトロアッセイにおいて触媒活性を示すように、プロテアーゼドメインもしくはその充分な部分を含む。また、完全長プロテアーゼの2本鎖活性化型およびまたプロテアーゼドメインの2本鎖型が、提供される。

40

【0155】

かくして、プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分をS Pの単鎖型として含む、単離された、実質的に純粋なプロテアーゼが、提供される。プロテアーゼドメインは、さらに長いタンパク質中に含まれることもできて、そのようなさらに長いタンパク質は、任意にM T S P 9チモーゲンである。

特に、例示的なプロテアーゼドメインは、配列番号16中のアミノ酸206～438に示

50

されるアミノ酸配列(配列番号15および17によりコード化される)の少なくとも十分な部分を含有する。

【0156】

記述のように、MTSPのプロテアーゼドメインは、チモーゲンが活性化されるとき切断部位(一般的には、矢印は切断部位を表す、コンセンサス配列R(下矢)VVGG、R(下矢)IVGG、R(下矢)IVQ、R(下矢)IVNG、R(下矢)ILGG、R(下矢)VGLL、R(下矢)ILGGもしくはそのバリエーション；N末端R(下矢)VまたはR(下矢)I)において生成したN末端(IV、VV、ILおよびIIのような)を持つ、単鎖ポリペプチドまたは2本鎖ポリペプチドである。R185およびI186の間の活性化切断(R(下矢)I)により生成された例示的MTSP9のプロテアーゼドメインは、配列番号17および18に示すように、配列R(下矢)IASGを含む。 10

【0157】

突然変異タンパク質および誘導体

完全長MTSP9、チモーゲンおよびその活性化型ならびにMTSP9のプロテアーゼドメイン、その部分、ならびにそのようなポリペプチドの突然変異タンパク質および誘導体が、提供される。機能的に活性であり、そしてセリンプロテアーゼ活性、免疫原性および抗原性のような、MTSP9ポリペプチドに関連する一つもしくはそれ以上の機能活性を示す能力のあるところのMTSP9のドメイン、フラグメント、誘導体もしくは類似体が提供される。

【0158】

誘導体の中には、マウスおよびラットのようなげっ歯類；ニワトリのような鳥類；ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジのような反芻動物；ブタのような豚；およびヒトを含むが、それらに限定されない、動物のMTSP9に基づくものがある。例えば、MTSP誘導体は、それらの配列を置換、付加もしくは欠失により変化することにより作成することができる。MTSP9誘導体としては、一次アミノ酸配列として、機能的に同等なアミノ酸残基が配列中の残基と置換されてサイレントな変化をもたらす変化した配列を含む、MTSP9のアミノ酸配列の全部もしくは一部を含有するものが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、配列内の一つもしくはそれ以上のアミノ酸残基は、機能的同等物として作用する類似の極性のもう一つのアミノ酸により置換されて、サイレントな変化をもたらすことができる。配列内のアミノ酸の代替品は、アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。極性の中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。正に荷電した(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが挙げられる。負に荷電した(酸性)アミノ酸としてはアスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる(例えば表1を参照)。アミノ酸の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%もしくは95%までが他のアミノ酸で置換された、MTSP9の突然変異タンパク質またはプロテアーゼドメインのようなそのドメインが、提供される。一般的には、そのような突然変異タンパク質は、突然変異していないタンパク質のプロテアーゼ活性の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%もしくは90%を保持する。 30 40

【0159】

アミノ酸の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%までが、さらに別なアミノ酸で置換されたところのMTSP9の突然変異タンパク質またはプロテアーゼドメインのようなそのドメイン、が提供される。一般的には、そのような突然変異タンパク質は、突然変異していないタンパク質のプロテアーゼ活性の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%もしくは90%を 50

保持している。

【0160】

本明細書において提供されるポリペプチドの中には、特異性およびプロテアーゼ活性が実質的に不変であるか、もしくは10、20、30、40、50%のような特定のパーセントだけ変化する(増加するもしくは減少する)ようなアミノ酸変化を持つMTSP9プロテアーゼドメインもしくはポリペプチドが含まれる。特に、膜貫通ドメインを有し、それに加えて膜貫通(TM)ドメイン、SEAドメインおよびセリンプロテアーゼ触媒ドメインを含むことができる、実質的に精製された哺乳動物MTSPポリペプチドが提供される。

【0161】

また、MTSP9と少なくとも60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含有する実質的に精製されたタンパク質が提供されて、そこではパーセンテージ同一性は、パーセンテージ同一性を最大にする標準的なアルゴリズムおよびギャップペナルティーを用いて測定される。他の哺乳動物のMTSP9ポリペプチドが意図されるが、ヒトMTSP9が含まれる。同一性の正確なパーセンテージは、もし必要ならば、特定されることができる。

【0162】

一つもしくはそれ以上のCys残基、特に活性化2本鎖型中では対をなしているがプロテアーゼドメインのみの中では対をなしていない残基、が任意のアミノ酸、必ずしもではないが、典型的にはセリンのような保存的アミノ酸残基、により置換された突然変異タンパク質が意図される。MTSP9におけるジスルフィド結合対は次の通りである：C₁₇₅-C₂₉₂、C₂₁₂-C₂₂₈、C₃₃₇-C₃₅₃、C₃₆₄-C₃₉₃。Cys₂₉₂はプロテアーゼドメイン内にあって、単鎖型のプロテアーゼドメイン内では対をなしていない。MTSP9の突然変異タンパク質、特に単鎖プロテアーゼドメイン内のCys₂₉₂のようなCys残基が、活性を消失させないSer、Gly、Alaのようなもう一つのアミノ酸で置換されたものが、提供される。また、配列番号16に示すアミノ酸配列を含むプロテアーゼドメインもしくはその触媒活性部分、または配列番号18に示すアミノ酸配列を含むプロテアーゼもしくはそのドメインと少なくとも約60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するところの触媒活性ドメインもしくはその部分を含む、実質的に精製されたMTSP9ポリペプチドおよびその機能性ドメインが、提供される。

【0163】

アミノ酸が他のアミノ酸で置換された、タンパク質の突然変異タンパク質もまた提供される。突然変異タンパク質の中には、Cys残基がセリンのような保存的アミノ酸残基で典型的に置換されたものがある。そのような突然変異タンパク質はまた、本明細書において提供される。アミノ酸の10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%もしくはそれ以上が置換されているが、得られたポリペプチドが同じ基質に対して非修飾型の触媒活性の少なくとも約10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%を保持しているところの突然変異タンパク質が提供される。

【0164】

突然変異タンパク質は、保存的アミノ酸置換およびまた非保存的アミノ酸置換を行うことにより作成させることができる。例えば、タンパク質の性質を望ましく変化させるアミノ酸置換を行うことができる。一つの実施態様では、ポリペプチドの分解を予防する突然変異を行うことができる。多くのプロテアーゼは、RおよびKのような塩基性残基の後で切断する；そのような切断をなくすために、塩基性残基が非塩基性残基で置換される。また、プロテアーゼドメイン外のアミノ酸における非保存的变化を、プロテアーゼ活性を変化させることなく実施することができる。プロテアーゼ活性以外の活性に責任があるアミ

ノ酸の非保存的变化は、望ましいであろう。例えば、阻害剤のプロテアーゼとの相互作用部位における非保存的な変化を行うことにより、触媒活性を保持しつつ、プロテアーゼの阻害剤との相互作用をブロックすることができる。同様に、受容体とプロテアーゼとの相互作用部位における非保存的なもしくは保存的な置換を行うことにより、触媒活性を変えことなく受容体結合を変えることができる。

【0165】

MTSP9ポリペプチドの少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50個、および典型的に10～15個のアミノ酸を含む抗原エピトープが、提供される。これらの抗原エピトープは、例えば、抗体を育成するために使用される。それぞれのエピトープに特異的な抗体もしくはその組合せ、ならびに単鎖および2本鎖型に対して特異的な抗体がまた、提供される。 10

【0166】

核酸分子、ベクターおよびプラスミド、細胞およびMTSP9ポリペプチドの発現
核酸分子

ヌクレオチドのコード配列の縮重性により、MTSPのような実質的に同一のアミノ酸配列をコード化する、他のヌクレオチド配列が意図される。これらとしては、配列内のアミノ酸残基をコード化する異なるコドンの置換により変更され、かくしてサイレントな変化を生成する、MTSP9コード化遺伝子の全部もしくは一部を含むところの核酸分子が挙げられるが、それらに限定されない。

【0167】

核酸

また、MTSP9をコード化する核酸分子およびコード化されたタンパク質が、本明細書において提供される。特に、そのスプライスバリエーションを含む、動物由来のMTSP9をコード化する核酸分子が提供される。また、コード化されたタンパク質が提供される。また、その機能ドメインが提供される。提供されるそれぞれの核酸分子について、核酸は、DNAもしくはRNAまたは他の核酸類似体であり得て、または非天然ヌクレオチド塩基を含み得る。また、MTSP9をコード化するヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む、単離核酸分子が、提供される。 20

【0168】

また、インビトロタンパク質分解酵素アッセイにおいてタンパク質分解活性を有し、そしてMTSP9ポリペプチドの完全長プロテアーゼドメインと少なくとも60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するところの、またはプロテアーゼドメインをコード化する核酸と、特に中等度、一般的には高度のストリンジェンシーで、それらの完全長に沿って、もしくは完全長核酸の少なくとも約70%、80%もしくは90%に沿ってハイブリダイズするところの単鎖もしくは2本鎖MTSPプロテアーゼをコード化する核酸分子が、提供される。上のように、コード化されたポリペプチドは、プロテアーゼを単鎖として含有する；その活性化型を生産し提供することができる。 30

【0169】

一つの実施態様では、MTSP9と呼称されるMTSPをコード化する核酸分子が、提供される。核酸分子は、配列番号17に示すヌクレオチド配列内のオープンリーディングフレームを含む。また、少なくとも程度、中等度のストリンジェンシー、そして一般的には高度のストリンジェンシーの条件下で、以下の核酸配列(配列番号5もしくは17)に、特にその単鎖プロテアーゼドメインもしくはMTSP9の任意のドメインをコード化する、ヌクレオチドにより包含されるオープンリーディングフレームに、ハイブリダイズする核酸分子が、提供される。 40

【0170】

特定の実施態様では、単離核酸フラグメントは、配列番号5もしくは17に示されるヌクレオチド配列を有する核酸と高度なストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズし、そ 50

して一般的には配列 5 また 17 に示されるヌクレオチド配列を含有する。タンパク質は、膜貫通ドメイン(TM)およびセリンプロテアーゼドメインを含有する。

【0171】

また、アミノ酸が他のアミノ酸で置換される、ポリペプチドをコード化する核酸分子の突然変異タンパク質が提供される。突然変異タンパク質の中には、Cys 残基をコード化するコドンが、セリンをコード化するコドンのような、他のアミノ酸残基で置換されるものがある。そのような突然変異タンパク質がまた、本明細書において提供される。そのようなドメインのそれぞれ、およびそのようなドメインをコード化するヌクレオチド配列を含む、核酸分子が本明細書において提供される。これに加えて、或るMTSPは、LDLRドメイン、スカベンジャー受容体のシステインに富む(SRCR)ドメインおよび他のドメインを含むことができる。 10

【0172】

単離核酸フラグメントは、ゲノムもしくはcDNAを含むDNA、またはRNAであり、またはタンパク質核酸および他のヌクレオチド類似体のような他の成分を含むことができる。単離核酸は、異種的なもしくは固有のプロモーターのようなさらに別な成分、ならびに他の転写および翻訳調節配列を含むことができ、これらの遺伝子は、受容体遺伝子もしくは他のインディケーター遺伝子またはインディケーターをコード化する遺伝子のような、他の遺伝子に連結することができる。

【0173】

また、MTSP9をコード化する上述のヌクレオチド配列と、少なくとも低度のストリンジェンシー、中等度のストリンジェンシー、および典型的には高度のストリンジェンシーでハイブリダイズし、そしてプロテアーゼドメインおよび／もしくは完全長または完全長プロテアーゼドメイン、もしくはMTSP9の他のドメインまたはそのスプライスバリエントもしくは対立遺伝子突然変異体の少なくとも70%、80%もしくは90%をコード化するところの核酸分子が、提供される。一般的には、分子は、そのような条件下で少なくとも一つのドメインに対する完全長に沿って、または完全長の少なくとも70%、80%もしくは90%に沿ってハイブリダイズし、そしてポリペプチドのプロテアーゼもしくは細胞外ドメインのような少なくとも一つのドメインをコード化する。特に、そのような核酸分子は、膜セリンプロテアーゼドメインの少なくとも一つのドメインをコード化する任意の単離核酸フラグメントを含み、それは、(1)プロテアーゼもしくはそのドメインをコード化するヌクレオチド配列を含有し、そして(2)、 20 30

(a)配列 15 もしくは 17 に示されるヌクレオチド配列を含む、プロテアーゼもしくはそのドメインをコード化するヌクレオチドの配列；

(b)そのような部分もしくは完全長のプロテアーゼをコード化し、そしてそのようなタンパク質またはそのフラグメントをコード化する、哺乳動物中に存在するmRNA転写物に相補的である核酸に一般的には、高度のストリンジェンシー下でハイブリダイズするところのヌクレオチドの配列；

(a)配列番号 5、15 もしくは 17 に示される配列と少なくとも約60%、70%、80%、90%もしくは95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、プロテアーゼまたはそのドメインをコード化するところのヌクレオチド配列； 40

(c)そのような部分もしくは完全長のオープンリーディングフレームによりコード化されるアミノ酸の配列を含む、膜貫通プロテアーゼもしくはそのドメインをコード化するところのヌクレオチドの配列；

(d)配列番号 5、15 もしくは 17 に示される配列と少なくとも60%、70%、80%、90%または95%の配列同一性を有するヌクレオチドの配列を含む、プロテアーゼもしくはそのドメインをコード化するところのヌクレオチドの配列；および

(e)そのようなサブユニットをコード化するヌクレオチドの配列によりコード化されるアミノ酸の配列を含む膜貫通プロテアーゼをコード化し、そしてmRNA転写物に相補的であるDNAに低度、中等度、もしくは高度のストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするところのヌクレオチドの配列； 50

の中から選択される。

【0174】

単離された核酸は、MTSP9コード化配列の少なくとも10ヌクレオチド、25ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、150ヌクレオチド、もしくは200ヌクレオチドまたはそれより多くの連続したヌクレオチド、または完全長SPコード化配列を含有することができる。もう一つの実施態様では、核酸は、35、200もしくは500ヌクレオチド長より小さい。MTSP9コード化核酸分子とハイブリダイズするかもしれない相補的である核酸は、単鎖もしくは2本鎖であり得る。例えば、MTSP9コード化核酸の少なくとも10、25、100もしくは200ヌクレオチドもしくは全コード領域、特にそのプロテアーゼドメインに相補的な(特に逆の相補体である)配列を含む核酸が、提供される。MTSP9については、完全長タンパク質またはそのドメインもしくは活性フラグメントがまた、提供される。

10

【0175】

プローブ、プライマー、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびdsRNA
また、プローブもしくはプライマーとして使用することができて、そして少なくとも約10ヌクレオチド、14ヌクレオチド、一般的には少なくとも約16ヌクレオチド、しばしば少なくとも約30ヌクレオチドを含有する、そのフラグメントが、提供される。プローブもしくはプライマーの長さは、探索されるゲノムのサイズの関数である；ゲノムが長ければ長いほど、単一の部位への特異的ハイブリダイゼーションに必要なプローブもしくはプライマーは長くなる。当業者は適切なサイズのプローブおよびプライマーを選択することができる。一般的には、説明されるプローブおよびプライマーは単鎖である。2本鎖のプローブおよびプライマーは、もしそれらが使用するときに変性されるならば、使用されることができる。

20

【0176】

核酸分子から由来したプローブおよびプライマーが、提供される。そのようなプローブおよびプライマーは、一般的には配列番号5のヌクレオチド634～71もしくは配列番号17のヌクレオチド1162～1279を除くMTSP9の連続したヌクレオチドと同一性を持つ少なくとも8、14、16、30、100個もしくはそれより多い連続したヌクレオチド、および配列番号5のヌクレオチド634～734を除く(配列番号18のヌクレオチド1162～1262を除く)、配列番号5のヌクレオチドの少なくとも30、50もしくは100個の連続した配列をを持つプローブを含有する。プローブおよびプライマーは、放射標識もしくは蛍光タグのような検出可能な標識で任意に標識され、または質量分析もしくは他の方法による検出用に質量を異にすることができる。

30

【0177】

また、MTSP9をコード化するヌクレオチド配列もしくはその部分に相補的である分子の配列を含む、単離核酸分子が、提供される。RNAiのような2重鎖RNA(dsRNA)がまた、提供される。

【0178】

プラスミド、ベクターおよび細胞

核酸分子を含有するプラスミドおよびベクターがまた、提供される。コード化されたタンパク質を発現する細胞を含む、ベクターを含有する細胞が、提供される。細胞は、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、もしくは動物細胞であり得る。例えば、コード化されたMTSPが細胞により発現される条件下で細胞を成長させ、そして発現したタンパク質を回収することにより、MTSPもしくはその単鎖型のプロテアーゼドメインを生産する方法が、本明細書において提供される。記述のように、MTSP9については、完全長のチモーゲンおよび活性化タンパク質ならびに活性化(2本鎖)プロテアーゼおよび単鎖プロテアーゼドメインが、提供される。本明細書において説明されるように、細胞は、分泌されるかもしれないもしくは細胞質中で発現されることができるタンパク質の発現に使用される。

40

【0179】

50

以下に議論するように、MTSP9ポリペプチド、およびその触媒的に活性な部分、を細胞の表面上で発現することができる。加えて、その全部もしくは一部を、天然もしくは異種のシグナルを用いて分泌タンパク質として発現することができる。これに代えて、ポリペプチドの全部もしくは一部を細胞質中に封入体として発現させて、それから単離することができる。得られたタンパク質は、必要ならば、折りたたみ直すように処理することができる。

上の議論は、例示したMTSP9の概観および若干の詳細を提供する。

【0180】

C. 腫瘍特異性および組織発現プロファイル

それぞれのMTSPは、特徴的な組織発現プロファイルを有している；特に、MTSPは10
ひたすら腫瘍中に限って発現されるかもしくは活性化されているわけではないが、特徴的な主要組織発現もしくは活性化のプロファイルを示す。或る場合には、MTSPの見かけの機能的活性を変えるところのその基質もしくは補助因子または受容体の変化のお陰で、MTSPは腫瘍細胞中において非腫瘍細胞とは異なる活性を有し得る。したがって、新生物形成性疾患を有しない単数もしくは複数の対象と比較しての、新生物形成性疾患を持つ対象(即ち哺乳動物、特にヒト)における活性および／もしくは発現のレベルのお陰で、それぞれが特定の腫瘍の診断マーカーとして役立ち得る。加えて、特定の組織における活性(および／もしくは発現)の検出は、新生物形成性疾患を示し得る。体液中の脱落したMTSPは、新生物形成性疾患を示し得る。また、それぞれの活性および／発現プロファイル20
のお陰で、それらはその活性のモジュレーターの投与、もしくはMTSPの一つにより特異的に活性化されるプロドラッグの投与によるような、治療の標的として役立ち得る。

【0181】

組織発現プロファイル

MTSP9

MTSP9は食道に高レベルで発現し、多くの他の組織では低レベルで発現する。MTSP9の転写物は、腎臓(成人および胎児)、脾臓(成人および胎児)、胎盤、肝臓(成人および胎児)、胸腺、末梢血リンパ球、肺(成人および胎児)、膵臓、リンパ節、骨髄、気管、子宮、前立腺、精巣、卵巣ならびに腺器官(乳腺、副腎、甲状腺、脳下垂体および唾液腺)に見出される。MTSP9はまた、食道腫瘍組織中に、肺癌中に、および低レベルで結腸直腸癌、リンパ腫、子宮頸癌(HeLaS3)ならびに白血病細胞株中にで発現されている30
。

【0182】

D. MTSP9ポリペプチド遺伝子の同定および単離

MTSPポリペプチドおよび／もしくはそのドメインは、タンパク質精製ならびに組換えタンパク質発現のための当分野において公知の方法により得られることができる。所望の遺伝子をコード化する核酸の同定のための当業者周知の任意の方法を、使用することができる。当分野において利用できる任意の方法を使用して、MTSPポリペプチドをコード化する完全長(即ち、全コード領域を包含する)cDNAもしくはゲノムDNAクローンを得ることができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して、正常および腫瘍細胞または組織中に発現される配列、例えばゲノムもしくはcDNAライブラリー中のMTSPポリペプチド(配列番号5および17)をコード化する核酸、を増幅することができる。同定された配列の3'および5'末端で配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーをプライマーとして使用して、適切な供給源(例えば腫瘍もしくは癌細胞)からの核酸のサンプル(RNAもしくはDNA)、一般的にはcDNAライブラリー、をPCRで増幅することができる。40

【0183】

PCRは、例えばPerkin-Elmer CetusサーマルサイクラーおよびTaqポリメラーゼ(Gene Amp[登録商標])を用いて実施されることができる。増幅されるDNAは、任意の真核生物種よりのmRNAもしくはcDNAまたはゲノムDNAを含むことができる。PCR反応における使用のために、いくつかの異なる縮重プライマーを合成することを選択するこ50

とができる。既知のヌクレオチド配列および単離される核酸同族体の間の、大きなもしくは小さな程度のヌクレオチドの類似性を許容することにより、核酸同族体を増幅するために(例えば、ヒト以外の生物種からのMTSPポリペプチド種を得るために、もしくはMTSP9ポリペプチドに相同なヒト配列を得るために)、PCR反応のプライミングにおいて使用されるハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変えることが、また可能である。種間ハイブリダイゼーションのためには、低いストリンジェンシーから中等度のストリンジェンシーの条件が、使用される。同種のハイブリダイゼーションのためには、中等度のストリンジェンシーから高度のストリンジェンシーの条件が、使用される。条件を、経験的に決定することができる。

【0184】

同定されたMTSPポリペプチド配列の全部もしくは一部を含有する核酸、もしくはMTSPポリペプチド同族体の全部もしくは一部をコード化する核酸の成功裏の増幅後、そのセグメントを分子的にクローニングしてシーケンシングし、完全なcDNAもしくはゲノムDNAを単離するために使用することができる。これは今度は、遺伝子の完全なヌクレオチドの決定、その発現の分析、および機能分析のためのそのタンパク質生成物の生産を可能にする。一旦ヌクレオチド配列が決定されれば、MTSPポリペプチド遺伝子のタンパク質産物をコード化するオープンリーディングフレームを、オープンリーディングフレームの決定のための当分野において公知の任意の方法、例えば公けに利用可能なヌクレオチド配列分析のためのコンピュータープログラムを用いて、決定することができる。一旦オープンリーディングフレームが規定されれば、オープンリーディングフレームによりコード化されるタンパク質のアミノ酸配列を決定することは、日常的である。この方式で、全MTSPポリペプチド遺伝子のヌクレオチド配列ならびにMTSPポリペプチドタンパク質および類似体のアミノ酸配列を、同定することができる。

【0185】

任意の真核細胞は潜在的に、MTSPポリペプチドの遺伝子の分子クローニングのための核酸供給源として役立ち得る。核酸を、脊椎動物、哺乳動物、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、トリ、ウマ、イヌ、ならびにさらに別な霊長類供給源、昆虫、植物および他の生物から、単離することができる。DNAを、クローン化DNA(例えばDNA''ライブラリー'')から化学合成により、cDNAクローニングにより、もしくは所望の細胞より精製されたゲノムDNAもしくはそのフラグメントのクローニングにより、当分野において公知の標準的手順で得ることができる(例えば、Sambrook et al. 1989、「分子クローニング、実験室マニュアル、第2版」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985、「DNAクローニング：実際的アプローチ」、MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II、を参照)。ゲノムDNAから由来したクローンは、コード化領域に加えて調節およびイントロンのDNA領域を含有し得る；cDNAから由来したクローンは、エクソン配列のみを含有しているであろう。任意の供給源についても、遺伝子は、その増幅のために適当なベクターの中にクローン化される。

【0186】

ゲノムDNAからの遺伝子の分子クローニングにおいては、DNAフラグメントが作成され、そのいくつかが所望の遺伝子をコード化するであろう。DNAを、種々の制限酵素を用いて特定の部位で切断することができる。これに代えて、マンガンの存在下にDNAアーゼを使用して、DNAを断片化することができるか、もしくはDNAを、例えば、超音波処理により物理的に剪断することができる。線状のDNAフラグメントは次いで、アガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動およびカラムクロマトグラフィーを含むが、それらに限定されない、標準的な技法により、サイズにしたがって分離することができる。

【0187】

一旦DNAフラグメントが生成されれば、所望の遺伝子を含有する特定のDNAフラグメントの同定を、多数の方式で達成することができる。例えば、MTSPポリペプチド(任意の背景物種の)の遺伝子(例えば、上述のようにして得られたPCR増幅産物、もしくはは

10

20

30

40

50

既知のヌクレオチド配列の一部の配列を有するオリゴヌクレオチド)またはその特異的 R N A もしくはその断片を、精製して、標識し、そして生成された D N A フラグメントを標識されたプローブとの核酸のハイブリダイゼーションにより、スクリーニングすることができる (Benton and Davis, Science 196:180 (1977); Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961 (1975))。プローブに実質的に相同性を持つこれらの D N A フラグメントは、ハイブリダイズするであろう。

【0188】

制限酵素消化(複数を含む)、そして、それが利用可能ならば、既知の制限マップにしたがって予想されるサイズとのフラグメントのサイズを比較することにより、もしくは D N A 配列分析および M T S P ポリペプチドの既知のヌクレオチド配列との比較により、適切なフラグメントを同定することがまた、可能である。さらなる選択を、遺伝子の性質に基づいて行うことができる。これに代えて、遺伝子の存在を、その発現された産物の物理的、化学的、もしくは免疫学的性質に基づくアッセイにより検出することができる。例えば、例えば類似のもしくは同一の電気泳動移動度、等電点電気泳動の挙動、タンパク質分解酵素による消化マップ、抗原的性質、セリンプロテアーゼ活性を有するタンパク質を生産するところの、適切な m R N A とハイブリッドを形成して選択する c D N A クローンもしくは D N A クローンを選択することができる。もし抗 M T S P ポリペプチド抗体が利用可能ならば、タンパク質は、E L I S A (酵素結合免疫吸着検査法)タイプの手順により、推定的に M T S P ポリペプチドを合成するクローンへの標識抗体の結合によって同定されることができる。

10

20

【0189】

M T S P 9 ポリヌクレオチドのゲノム D N A の単離に対する代替法としては、既知の配列からの遺伝子配列を化学的に合成すること、もしくは M T S P ポリペプチドをコード化する m R N A に合わせて c D N A を作成することが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、M T S P ポリペプチド遺伝子の c D N A クローニングのための R N A を、タンパク質を発現している細胞から単離することができる。次いで、同定されて、単離された核酸を、適切なクローニングベクター内に挿入することができる。当分野において公知の多数のベクター宿主系を、使用することができる。可能なベクターとしては、プラスミドもしくは修飾されたウイルスが挙げられるが、これらに限定されないが、しかしベクターシステムは使用する宿主細胞と適合性でなければならない。そのようなベクターとしては、ラムダ誘導体のようなバクテリオファージ、または p B R 3 2 2 もしくは p U C プラスミド誘導体または Bluescript ベクター (Stratagene, La Jolla, CA) のようなプラスミドが挙げられるが、これらに限定されない。クローニングベクターへの挿入は、例えば、相補的な付着末端を有するクローニングベクター中に D N A フラグメントを結合することにより、達成されることができる。もし D N A を断片化させるために使用した相補的制限部位がクローニングベクター中に存在しないならば、D N A 分子の末端を、酵素的に修飾することができる。これに代えて、所望の任意の部位を、ヌクレオチド配列(リンカー)を D N A 末端上に結合することにより、作成することができる; これらの結合したリンカーは、制限酵素認識配列をコード化する特異的な化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含むことができる。さらに別な方法では、切断されたベクターおよび M T S P ポリペプチド遺伝子を、ホモポリマーの尾部を付けることにより、修飾することができる。組換え分子を、形質転換、形質移入、感染、エレクトロポレーション、カルシウム沈殿および他の方法を介して宿主細胞内に導入することができるので、遺伝子配列の多数のコピーが作成される。

30

40

【0190】

特別の態様では、単離された M S P ポリペプチドの遺伝子、c D N A、もしくは合成された D N A 配列を組み込むところの組換え D N A 分子による宿主細胞の形質転換は、遺伝子の複数のコピーの作成を可能にする。かくして、形質転換体を増殖させ、形質転換体から組換え D N A 分子を単離し、必要なときには、単離された組換え D N A から挿入された遺伝子を回収することにより、遺伝子を大量に得ることができる。

50

【0191】

E. M T S P ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインをコード化する核酸を含有するベクター、プラスミドおよび細胞、ならびにM T S P ポリペプチドの発現ベクターおよび細胞

一つもしくはそれ以上のM T S P ポリヌクレオチドの組換え発現のために、M T S P ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含有する核酸を、適切な発現ベクター、即ち、挿入されたタンパク質コード化配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含有するベクター、の中に挿入することができる。必要な転写および翻訳シグナルはまた、M T S P 遺伝子用の天然のプロモーター、および／もしくはそれらの隣接領域、により供給されることができる。

10

【0192】

また、M T S P をコード化する核酸を含有するベクターが提供される。ベクターを含有する細胞がまた、提供される。細胞は、真核細胞および原核細胞を含み、そしてベクターは、その中での使用のために任意の適当のものである。

内皮細胞を含み、ベクターを含有する、原核細胞および真核細胞が提供される。そのような細胞としては、は細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞が挙げられる。細胞を使用して、(a)コード化されたM T S P ポリペプチドもしくはM T S P ポリペプチドのプロテアーゼドメインが細胞により発現される、条件下で、上述の細胞を成長させて、そして次いで(b)発現されたプロテアーゼドメインタンパク質を回収することにより、M T S P ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインを生産する。例示される実施態様では、プロテアーゼドメインは、培地中に分泌される。

20

【0193】

一つの実施態様では、プロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコード化し、そしてS P タンパク質のプロテアーゼドメインの全部もしくは一部だけ、またはその複数のコピーを含有するポリペプチドをコード化する、ヌクレオチドの配列を含むところのベクターが提供される。また、S P タンパク質のプロテアーゼドメインおよび完全長S P タンパク質を含むまでのさらに別な部分、ならびにその複数コピーをコード化するヌクレオチドの配列を含むところのベクターが、提供される。ベクターは、細胞中におけるS P タンパク質もしくはそのプロテアーゼドメインの発現を求めて、またはS P タンパク質が分泌タンパク質として発現されるように、選択されることができる。これに代えて、ベクターは、コード化されたタンパク質の分泌に必要なシグナルを含むことができる。プロテアーゼドメインが発現されるときには、核酸は、*Saccharomyces cerevisiae*の α 接合因子もしくはその一部分、または固有のシグナル配列のような分泌シグナル、をコード化する核酸に連結している。

30

【0194】

種々のホスト-ベクターシステムを使用して、タンパク質をコード化する配列を発現させることができる。これらとしては、ウイルス(例えばワクシニアウイルス、アデノウイルス、等)で感染した哺乳動物細胞システム；ウイルス(例えばバキュロウイルス)で感染した昆虫細胞システム；酵母のベクターを含有する酵母のような微生物；またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAで形質転換した細菌が挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの発現エレメントは、それらの強度および特異性において異なる。使用される宿主-ベクターシステムに依存して、多数の適当な転写および翻訳エレメントの任意の一つを使用することもできる。

40

【0195】

核酸フラグメントをベクターの中に挿入するための、当業者に公知の任意の方法を使用して、適切な転写／翻訳調節シグナルおよびタンパク質コード化配列を含有するキメラ遺伝子を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、インビトロ組換えDNAおよび合成的技法ならびにインビボ組換え(遺伝的組換え)を含むことができる。M T S P ポリペプチド、またはそのドメイン、誘導体、フラグメントもしくは同族体をコード化する核酸配列の発現は、遺伝子もしくはそのフラグメントが、組換えDNA分子で形

50

質転換された宿主中で発現されるように、第2の核酸配列によって調節されることができる。例えば、タンパク質の発現を、当分野において公知の任意のプロモーター／エンハンサーによっても調節することができる。

【0196】

使用することができるプロモーターとしては、SV40の初期プロモーター(Bernoist and Chambon, Nature 290:304-310 (1981))、Rousサルコマウイルスの3'側の長末端反復に含有されるプロモーター(Yamamoto et al., Cell 22:787-797 (1980))、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982))；ベーターラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731 (1978))もしくはtacプロモーター(DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983))のような原核生物の発現ベクター；''組換え細菌からの有用タンパク質''：Scientific American 242:79-94 (1980)も参照のこと；ノバリン合成酵素プロモーターを含有する植物の発現ベクター(Herrar-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984))もしくはカリフラワーモザイクウイルスの35S RNAPプロモーター(Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9:2871 (1981))、および光合成酵素リブローズビスホスフェートカルボキシラーゼ(Herrera-Estrella et al., Nature 310:115-120 (1984))；Gal4プロモーターのような酵母および他の真菌からのプロモーターエレメント、アルコール脱水素酵素プロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター、ならびに組織特異性を示して、トランスジェニック動物に使用されてきた以下の動物の転写制御領域：膵臓の腺房細胞で活性なエラスターゼI遺伝子制御領域(Swift et al., Cell 38:639-646 (1984))；Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986)；MacDonald, Hepatology 7:425-515 (1987))；膵臓ベータ細胞中で活性なインスリン遺伝子制御領域(Hanahan et al., Nature 315:115-122 (1985))、リンパ球中で活性なイムノグロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al., Cell 38:647-658 (1984))；Adams et al., Nature 318:533-538 (1985)；Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7:1436-1444 (1987))、精巣、乳腺、リンパ球および肥満細胞中で活性なマウス乳癌ウイルスの制御領域(Leder et al., Cell 45:485-495 (1986))、肝臓中で活性なアルブミン遺伝子制御遺伝子(Pinckert et al., Genes and Devel. 1:268-276 (1987))、肝臓中で活性なアルファフェトタンパク質遺伝子の制御領域(Krumlauf et al., Mol. Cell Biol. 5:1639-1648 (1985))；Hammer et al., Science 235:53-58 (1987))、肝臓で活性なアルファ1アンチトリプシン遺伝子の制御領域(Kelsey et al., Genes and Devel. 1:161-171 (1987))、骨髄細胞中で活性なベータグロブリン遺伝子の制御領域(Mogram et al., Nature 315:338-340 (1985))；Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986))、脳の乏突起膠細胞中で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子の制御領域(Readhead et al., Cell 48:703-712 (1987))、骨格筋中で活性なミオシン軽鎖-2遺伝子の制御領域(Sani, Nature 314:283-286 (1985))、および視床下部の性腺刺激ホルモン分泌細胞中で活性な生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子の制御領域(Mason et al., Science 234:1372-1378 (1986))、挙げられるが、それらに限定されない。

【0197】

特定の実施態様では、MTSPポリペプチド、またはそのドメイン、フラグメント、誘導体もしくは同族体、をコード化する核酸に機能しうるように結合されたプロモーター、一つもしくはそれ以上の複製開始点、および任意の一つもしくはそれ以上の選択可能なマーカ(例えば、抗生物質抵抗性遺伝子)を含有するところのベクターが使用される。MTSPポリヌクレオチドのコード配列もしくはその一部分を含有する発現ベクターは、例えば、コード化部分を3個のpGEXベクター(グルタチオンS-トランスフェラーゼ発現ベクター(Smith and Johnson, Gene 7:31-40 (1988))のそれぞれのEcoRI制限部位にサブクローン化することにより、作成される。これは、正しい読み取り枠での生成物の発現を可能にする。MTSPポリペプチドのプロテアーゼドメインの発現のための例示的なベクターおよびシステムとしては、公知のPichiaベクター(例えばInvitrogen, San Diego,

10

20

30

40

50

CAから入手可能)、特にコード化されたタンパク質の分泌用にデザインされたもの、が挙げられる。タンパク質を、封入体中のように、細胞質内で発現することができる。一つの例示的なベクターが実施例中で説明される。

【0198】

E. coli細胞の形質転換のためのプラスミドとしては、例えば、pET発現ベクター(米国特許第4,952,496号を参照;NOVAGEN, Madison, WIより入手可能;システムを記載したNovagen社発行の文献をまた、参照)が挙げられる。そのようなプラスミドとしては、T7lacプロモーター、T7ターミネーター、誘導性E. coli lacオペレーター、およびlacリプレッサー遺伝子を含むpET11a; T7プロモーター、T7ターミネーター、およびE. coli ompT分泌シグナルを含むpET12a-c; ならびに、Hisカラムによる精製における使用のためのHis-Tag[登録商標]リーダー配列、およびカラムによる精製に続いて切断を可能にするトロンビン切断部位、を含むpET15bおよびpET19b(NOVAGEN, Madison, WI); T7-lacプロモーター領域ならびにT7ターミネーター、が挙げられる。

10

【0199】

ベクターは、Pichia細胞および、E. coliのような、細菌細胞のような宿主細胞に導入されて、その中でタンパク質が発現される。例示的なPichia株としては、例えば、GS115が挙げられる。例示的な細菌宿主としては、lacUVプロモーター(米国特許第4,952,496号を参照)のような誘導性プロモーターに機能するように結合したT7 RNAポリメラーゼコード化DNAの染色体コピー、が挙げられる。そのような宿主としては、溶原性E. coli株BL21(DE3)が挙げられるが、これに限定されない。

20

【0200】

タンパク質の発現および生産

MTSPドメイン、誘導体および類似体は、当分野において公知の種々の方法によって生産されることができる。例えば、一旦MTSPポリペプチド、またはそのドメイン、フラグメントもしくは誘導体を発現する組換え細胞が同定されれば、個別の遺伝子産物を単離して、分析することができる。これは、生産物の放射能標識に続けてゲル電気泳動による分析、イムノアッセイ、マーカー標識産物への架橋、およびタンパク質分解活性を含むが、それらに限定されない、タンパク質の物理的および／もしくは機能的性質に基づくアッセイにより達成される。

30

【0201】

MTSPポリペプチドは、カラムクロマトグラフィー(例えばイオン交換、アフィニティー、ゲル排除、逆相高速および迅速タンパク質液体)、分別遠心、分別溶解性を含むが、それらに限定されない、当分野において公知の標準的な方法により、もしくはタンパク質の精製のために使用される任意の他の標準的技法により、単離して、精製することができる(天然の供給源または複合体もしくはタンパク質を発現している組換え宿主細胞から)。

【0202】

これに代えて、一旦MTSPポリペプチドまたはそのドメインもしくは誘導体が同定されれば、それをコード化する遺伝子のヌクレオチド配列から、タンパク質のアミノ酸配列を推定することができる。その結果、タンパク質またはそのドメインもしくは誘導体を、当分野において公知の標準的な化学的方法(例えば、Hunkapiller et al, Nature 310:105-111 (1984)、を参照)により合成することができる。

40

【0203】

MTSPポリペプチド配列の操作を、タンパク質レベルで行うことができる。また、翻訳中もしくは後に、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解的切断、抗体分子もしくは他の細胞性リガンドへの結合により、差別的に修飾されるところのMTSPポリペプチドタンパク質、そのドメイン、誘導体または類似体もしくはフラグメントが、本明細書において意図される。任意の夥しい数の化学的修飾を、臭化シアンによる特異的的化学切断、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄、アセチル化、ホルミル化、酸

50

化、還元、ツニカマイシンおよび他のそのような剤の存在下での代謝的合成を含むが、それらに限定されない、既知の技法により実施することができる。

【0204】

加えて、MTSPポリペプチドのドメイン、類似体および誘導体を、化学的に合成することができる。例えば、所望のドメインを含むかもしくはインビトロで所望の活性を仲介するところのMTSPポリペプチドの一部に相当するペプチドを、ペプチド合成機の使用により合成することができる。さらに、所望により、非古典的アミノ酸もしくは化学的アミノ酸類似体を、MTSPポリペプチド配列中に置換もしくは付加として導入することができる。非古典的アミノ酸としては、通常のアミノ酸のD異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 ϵ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、 β -メチルアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸のようなデザイナーアミノ酸、およびアミノ酸類似体一般、が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸は、D(右旋性)もしくはL(左旋性)であり得る。

10

【0205】

天然の生産物が突然変異体であることが疑われるかもしくは新しい生物種より単離される場合には、天然の供給源から単離されたMTSPポリペプチド、およびインビトロで発現されたMTSPポリペプチド、またはインビボもしくはインビトロで合成された発現ベクター由来のMTSPポリペプチドのアミノ酸配列を、DNA配列の分析から、もしくはこれに代えて単離されたタンパク質の直接シーケンシングにより、決定することができる。そのような分析を、手作業のシーケンシングもしくは自動化アミノ酸シーケンサーの使用により実施することができる。

20

【0206】

修飾

MTSPポリペプチドおよびドメインの種々の修飾が、本明細書において意図される。MTSPコード化核酸分子は、当分野において公知の夥しい数の戦略のいずれによっても修飾されることができる(例えば、Sambrook et al. 1989、「分子クローニング、実験室マニュアル、第2版」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、を参照)。配列を、制限エンドヌクレアーゼにより適切な部位で切断することができて、続いて、所望により、さらなる酵素的修飾を行い、単離し、インビトロで結合する。MTSPのドメイン、誘導体もしくは類似体をコード化する遺伝子の生産においては、修飾された遺伝子が、所望の活性がコード化されている遺伝子領域において、翻訳停止シグナルにより中断されていない元の翻訳用リーディングフレームを保持していることを保証するよう注意を払うべきである。

30

【0207】

加えて、MTSPコード化核酸分子は、翻訳、開始、および／もしくは終結配列を創成しならびに／または破壊するために、またはコード領域内に突然変異を創成しならびに／またはさらなるインビトロ修飾を容易にするために、新しいエンドヌクレアーゼ部位を形成しまたは既存のものを破壊するために、インビトロまたはインビボで突然変異させることができる。また、本明細書において説明されるように、Cys残基の置換およびグリコシル化部位の除去もしくは付加のような一次配列の変化を持つ突然変異体が意図される；配列番号18のMTSは、二つの潜在的グリコシル化部位を有している。そのような突然変異は、化学的突然変異誘発およびインビトロの部位特異的突然変異誘発(Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253:6551-6558 (1978))、TAB(登録商標)リンカー(Pharmacia)を含むが、それらに限定されない、当分野において公知の突然変異誘発のための任意の技法によって、達成されることができる。一つの実施態様では、例えば、MTSPポリペプチドもしくはそのドメインは、蛍光標識を含むように修飾される。別の特定の実施態様で

40

50

は、MTSPポリペプチドは、ヘテロ2機能性試薬を有するように修飾され、そのようなヘテロ2機能性試薬は、複合体のメンバーを架橋するために使用される。

【0208】

加えて、MTSPのドメイン、類似体および誘導体を、化学的に合成することができる。例えば、所望のドメインを含むかもしくはインビトロで所望の活性を仲介するところのMTSPの一部分に相当するペプチドを、ペプチド合成機の使用により合成することができる。さらに、所望により、非古典的アミノ酸もしくは化学的アミノ酸類似体を、MTSP配列中に置換もしくは付加として導入することができる。非古典的アミノ酸としては、通常のアミノ酸のD異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 ϵ -Abu、e-Ahx、6-アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、 β -メチルアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸のようなデザイナーアミノ酸、およびアミノ酸類似体一般、が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸はD(右旋性)もしくはL(左旋性)であり得る。

10

【0209】

F. スクリーニング法

本明細書に示すように、単鎖プロテアーゼドメインを、その活性を調節する化合物を同定するために種々の方法で使うことができる。腫瘍細胞中においてさらに高い活性もしくは発現を示すSPについては、タンパク質分解活性を阻害する化合物が、特に興味深い。腫瘍細胞中においてさらに低いレベルで活性であるSPについては、活性を促進する化合物もしくは剤が、潜在的に興味深い。全ての場合において、同定された化合物は、癌処置の候補である剤を含む。

20

【0210】

いくつかの種類のアッセイが本明細書において例示されそして説明される。プロテアーゼドメインは他のアッセイに使用できることが、理解されている。しかしながら、単鎖プロテアーゼドメインが触媒活性を示すことが、本明細書において示される。したがって、それらは、インビトロのスクリーニングアッセイのために理想的である。それらはまた、結合アッセイにも使用されることができる。

30

【0211】

MTSP9の完全長チモーゲン、活性化酵素、単鎖および2本鎖プロテアーゼドメインが、本明細書において提供されるアッセイを含めて、当業者周知の任意のスクリーニングアッセイにおける使用のために意図される。したがって、以下の説明は、タンパク質分解アッセイに向けられるならば、MTSP9を含む任意のSPの単鎖プロテアーゼドメインもしくはその触媒的に活性な部分に適用するものとする。特に、そのスプライスバリエーションのような任意の変異体を含むMTSP9との使用のために、結合アッセイのような他のアッセイが、本明細書において提供される。

【0212】

1. SPタンパク質のプロテアーゼドメインを調整する剤の同定のための触媒的アッセイ
SP、特にその単鎖プロテアーゼドメインもしくは触媒的に活性な部分、の触媒活性のモジュレーターを同定するための方法が、本明細書において提供される。方法は、MTSP9、完全長チモーゲンもしくは活性化型、および特にその単鎖ドメインを試験物質の存在下にMTSP9の基質と接触させること、ならびに基質のタンパク質分解を検出し、それによってMTSP9の活性を評価し、そして活性を対照と比較すること：により、実行される。例えば、対照は、完全長のチモーゲンもしくは活性化型、および特にその単鎖ドメイン、特にその単鎖ドメインを含むMTSP9をMTSP9の基質と接触させること、ならびに基質のタンパク質分解を検出し、それによってMTSP9の活性を評価すること、により評価されるMTSP9の活性であり得る。試験化合物の存在および不在下における結果が比較される。活性の差は、試験物質がMTSP9の活性を調整することを示す。MT

40

50

S P 9 の活性化切断の活性化因子がまた、意図される；そのようはアッセイは以下に議論される。

【0213】

一つの実施態様では、上のスクリーニング法において複数の試験物質が同時にスクリーニングされる。もう一つの実施態様では、標的細胞に潜在的に特異的である、剤を次いで同定するための手段として、M T S P 9 が標的細胞から単離される。

もう一つの実施態様では、試験物質は治療用化合物であり、そしてそれによって試験物質の存在下および不在下で測定されたM T S P 9 活性の差は、標的細胞が治療用化合物に応答することを示す。

【0214】

一つの方法は、(a)M T S P 9 ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインを一つまたは複数の試験化合物と、リガンドおよび化合物の間の相互作用を助長する条件下で接触させること、ならびに(b)リガンドに特異的に結合する一つもしくは複数の化合物を同定することのステップを含む。

【0215】

本明細書において提供されるもう一つの方法は、a)M T S P 9 ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインをM T S P 9 の基質と接触させ、そして基質のタンパク質分解を検出し、それによってM T S P 9 の活性を評価すること；b)M T S P 9 ポリペプチドを試験物質の存在下にM T S P 9 ポリペプチドの基質と接触させ、そして基質のタンパク質分解を検出し、それによってM T S P 9 の活性を評価すること；ならびにc)ステップa)およびb)において評価したM T S P 9 ポリペプチドの活性を比較することのステップを含み、それによってステップa)において測定された活性がステップb)で測定された活性と異なることは、試験物質がM T S P 9 ポリペプチドの活性を調整することを示す。

【0216】

もう一つの実施態様では、複数の試験物質が同時にスクリーニングされる。試験物質がM T S P 9 ポリペプチドのモジュレーターであるか否かを評価するために、試験物質の存在下および不在下でのM T S P 9 ポリペプチドの活性を比較する際に、活性を並行してアッセイすることは、そのような並行測定が典型的ではあるが、不必要である。M T S P 9 ポリペプチドの活性を一つの時点で測定して、測定された活性をM T S P 9 ポリペプチドの活性の歴史的な値と比較することが可能である。

【0217】

例えば、試験物質の存在下にM T S P 9 ポリペプチドの活性を測定し、そして試験物質の不在下に先に測定したM T S P 9 ポリペプチドの活性の歴史的な値と比較すること、およびその逆を行うことができる。これは例えば、アッセイを行うためのキットと共に提供される折込みもしくはパンフレットに、M T S P 9 ポリペプチドの活性を提供することによって達成することができる。

特定のS Pのための基質を選択するための方法が実施例に説明されて、そして特定のタンパク質分解アッセイが例示される。

【0218】

組合せおよびアッセイを実施するための説明書を任意に含む組合せを含有するキットが提供される。組合せは、M T S P 9 ポリペプチドおよびアッセイするべきM T S P 9 ポリペプチドの基質；ならびに任意に基質のタンパク質分解を検出するための試薬を含む。タンパク質を含む、特定のM T S P 9 ポリペプチドによるタンパク質分解に供される、色素生産性もしくは蛍光発生の分子であり得るところの基質は、試験基質を切断するM T S P 9 ポリペプチドの能力を試験することにより経験的に同定されることができる。最も効率よく(即ち、最も低い濃度および／もしくは最も早い速度で、または好ましい条件で)切断される基質が同定される。

【0219】

これに加えて、上述の組合せを含有するキットが、本明細書において提供される。キットは、M T S P 9 ポリペプチドの活性のモジュレーターを同定するための説明書を任意に含

10

20

30

40

50

む。任意のMTSP9ポリペプチドは、その活性のモジュレーターを同定するための標的として意図される。

【0220】

2. 結合アッセイ

剤、特にMTSP9に結合する化合物、の同定および単離のための方法が、本明細書において提供される。アッセイは、チモーゲン型、単鎖の単離されたプロテアーゼドメイン(もしくはMTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインを含有する、MTSP9ポリペプチド以外のタンパク質)に、および完全長チモーゲンからまたは伸長されたプロテアーゼドメインから由来した活性化型を含む活性化型に結合する剤を同定するようにデザインされる。同定された化合物は、腫瘍ならびに他の障害および異常な血管新生を含む疾患の処置のための化合物の同定のための候補物もしくはリードである。方法において使用されるMTSP9ポリペプチドは、本明細書において規定した、MTSP9の単鎖プロテアーゼドメインもしくはそのタンパク質分解的に活性な部分を含む、任意のMTSP9ポリペプチドを含む。

10

【0221】

種々の方法が、本明細書において提供される。これらの方法は、溶液中において、またはMTSP9ポリペプチド(複数を含む)もしくはそのプロテアーゼドメイン(複数を含む)が固体支持体に直接またはリンカーを介して間接的に結合された固相反応において、実施され得る。スクリーニングアッセイは実施例に説明され、そしてこれらのアッセイは、候補化合物を同定するために使用されてきている。本明細書における目的には、上述の全ての結合アッセイがMTSP9のために提供される。

20

【0222】

MTSP9の単鎖プロテアーゼドメイン、チモーゲンまたは完全長の活性化MTSP9もしくはその2本鎖プロテアーゼドメインに特異的に結合する、化合物のような剤を同定するための方法が、本明細書において提供される。方法を、(a)MTSP9と剤との間の結合を助長する条件下で、MTSP9を一つもしくは複数の試験剤と接触させること；そして(b)MTSP9に特異的に結合する、多数の中の一つもしくはそれ以上の剤を同定することにより、実施することができる。

【0223】

例えば、そのような方法を実施するに際して、MTSP9ポリペプチドは、潜在的結合相手または細胞の抽出物もしくはフラクションと、潜在的結合相手とポリペプチドとの会合を許容する条件下で混合される。混合した後、MTSP9と会合したペプチド、ポリペプチド、タンパク質もしくは他の分子を、混合物から分離する。次いで、MTSP9に結合した結合相手を取り外して、さらに分析することができる。結合相手を同定しそして単離するために、全タンパク質、例えば、配列番号6の開示されたタンパク質全体、を使用することができる。これに代えて、タンパク質のフラグメントを使用することができる。

30

【0224】

細胞抽出物、もしくは血液、血清、尿、汗、滑液、CSFおよび他のそのような流動体のような体液、を得るために、種々の方法を使用することができる。物理的な破壊法の例としては、超音波処理および機械的剪断が挙げられるが、これらに限定されない。化学的溶解の例としては、界面活性剤による溶解および酵素溶解が挙げられるが、これらに限定されない。熟練者は、細胞抽出物を調製するための方法を、本法における使用のための抽出物を得るために容易に適合させることができる。

40

【0225】

一旦細胞の抽出物が調製されれば、抽出物は、タンパク質と結合相手との会合が起こり得る条件下で、MTSP9と混合される。ヒトの細胞の細胞質中、もしくは血液のような、体液中に見出される条件に類似した条件を含む、種々の条件を使用することができる。浸透圧、pH、温度、および使用される細胞抽出物の濃度のような特性を、タンパク質と結合相手との会合を至適化するように変化させることができる。同様に、体液からの興味のある分子の単離のための方法は公知である。

50

【0226】

適切な条件下で混合した後、結合した複合体を混合物から分離する。種々の技法を使用して、混合物を分離することができる。例えば、MTSP9に特異的な抗体を使用して、結合相手との複合体を免疫沈殿させることができる。これに代えて、クロマトグラフィーおよび密度／沈降遠心のような標準的な化学的分離技法を使用することもできる。

抽出物中の非会合細胞成分を除去した後、結合相手を、従来の方法を用いて複合体から解離させることができる。例えば、解離を、混合物の塩濃度もしくはpHを変化させることにより達成することができる。

【0227】

混合抽出物から会合した結合相手との対を分離するのを支援するために、MTSP9を固体支持体上に固定化することができる。例えば、タンパク質をニトロセルロースマトリックスもしくはアクリルビーズに付着させることができる。タンパク質もしくはそのフラグメントの固体支持体への付着は、抽出物に見出される他の成分からペプチド／結合相手の対を分離するのを支援する。同定された結合相手は、単一のタンパク質または二つもしくはそれ以上のタンパク質から作製される複合体のどちらかであり得る。

【0228】

これに代えて、単鎖のプロテアーゼをコード化する核酸分子を、酵母の二ハイブリッドシステムで 사용할 ことができる。酵母の二ハイブリッドシステムは、他のタンパク質対を同定するために使用されてきており、本明細書において説明する核酸分子を使用するように容易に適合させることができる。

【0229】

もう一つのインビトロ結合アッセイは、特にMTSP9のためには、これらのタンパク質の一つの少なくとも触媒ドメインを含有するポリペプチドおよび一つもしくはそれ以上の候補結合標的または基質との混合物を使用する。混合物を適切な条件下でインキュベートした後、MTSP9もしくは触媒ドメインを含有するそのポリペプチドフラグメントが基質候補と相互作用する能力を評価する。無細胞系アッセイのためには、成分の一つは、検出可能な標識を含むかもしくはこれに連結される。標識は、放射活性、蛍光、吸光度もしくは電子密度等のように直接の検出を、またはエピトープタグ、酵素等のような間接的検出、を提供する。種々の方法を使用して、標識の性質および他のアッセイ成分に依存して、標識を検出することができる。例えば、固体の基質に結合した標識を検出することができるか、もしくは標識を含有する結合した複合体の一部を固体の基質から分離し、そして標識をその後検出することができる。

【0230】

3. シグナル伝達の検出

膜貫通タンパク質であるMTSP9は、シグナル伝達に直接的にもしくは間接的に、細胞表面受容体として直接的に、またはシグナル伝達を開始し得る増殖因子の前駆体のようなタンパク質を活性化することにより間接的に、関与し得る。

【0231】

加えて、MTSP9の細胞外ドメインのようなMTSP9の分泌物は、細胞表面の受容体と結合もしくは相互作用することにより直接的に、もしくはシグナル伝達を開始し得る増殖因子の前駆体のようなタンパク質を活性化することにより間接的にのどちらかで、シグナル伝達に関与し得る。シグナル伝達を評価するためのアッセイは、当業者に周知であって、MTSP9ポリペプチドとの使用のために適合させることができる。

【0232】

細胞の表面上のMTSP9、特にMTSP9の完全長、もしくはその細胞外ドメインもしくは機能部分を繋ぎとめるために十分な部分により、直接的に、もしくは増殖因子前駆体の活性化を介するような間接的に仲介されるシグナル伝達に影響するかもしくはこれを変化させる剤の同定のためのアッセイが、提供される。そのようなアッセイは、例えば、転写に基づくアッセイを含み、そこでは伝達されたシグナルの調整が、レポーター遺伝子からの発現に対する効果を検出することにより評価される(例えば、米国特許第5,436,

10

20

30

40

50

128号、を参照)。

【0233】

4. M T S P 9をコード化する核酸の発現を調整する剤を同定する方法

もう一つの実施態様は、M T S P 9をコード化する核酸の発現を調整する、剤を同定するための方法を提供する。そのようなアッセイは、M T S P 9をコード化する核酸の発現レベルの変化をモニターする任意の利用可能な手段を使用する。

【0234】

一つのアッセイフォーマットでは、M T S P 9もしくはそのドメイン、特にプロテアーゼドメインのオープンリーディングフレームおよび任意のアッセイ可能な融合相手との間のレポーター遺伝子融合体を含むところの細胞株を調製することができる。ホタルルシフェラーゼ遺伝子およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコード化する遺伝子(Alam et al., Anal. Biochem. 188: 245-54 (1990))を含む、夥しい数のアッセイ可能な融合相手が公知であり、容易に入手可能である。次いで、レポーター遺伝子融合体を含む細胞株は、適切な条件下および時間で、検査すべき剤に曝露される。剤に曝露したサンプルと対照サンプルとの間のレポーター遺伝子の差次的発現が、M T S P 9をコード化する核酸の発現を調整する剤を同定する。

10

【0235】

さらに別なアッセイフォーマットを使用して、M T S P 9をコード化する核酸の発現を調整する剤の能力をモニターすることができる。例えば、核酸へのハイブリダイゼーションにより、m R N A発現を直接モニターすることができる。細胞株を適切な条件下および時間で、試験すべき剤に曝露し、そして標準的な手順により総R N Aもしくはm R N Aを単離する(例えば、Sambrook et al. 1989、「分子クローニング、実験室マニュアル、第2版」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、を参照)。剤に曝露した細胞と対照細胞との間のR N A発現レベルの差を検出するプローブを、核酸から調製することができる。高度のストリンジェンシーの条件下で標的核酸とのみハイブリダイズするところのプローブをデザインすることは、典型的であるが必要ではない。高度のストリンジェンシーの条件下では、高度に相補的な核酸のみがハイブリダイズする。したがって、アッセイ条件のストリンジェンシーが、ハイブリッドを形成するために二つの核酸鎖の間に存在するべき相補性の量を決定する。ストリンジェンシーは、プローブ：標的ハイブリッドと潜在的プローブ：非標的ハイブリッドとの間の安定性の差を最大化するように選択されるべきである。

20

30

【0236】

プローブを、当分野において公知の方法により核酸からデザインすることができる。例えば、プローブのG + C含量およびプローブの長さは、その標的配列へのプローブの結合に影響を及ぼし得る。プローブの特異性を至適化するための方法は、一般的には利用可能である(例えば、Sambrook et al. 1989、「分子クローニング、実験室マニュアル、第2版」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; およびAusubel et al. (1995)、「分子生物学における最新のプロトコル」、Greene Publishing Co., NY、を参照)。

【0237】

ハイブリダイゼーションの条件は、それぞれのプローブについて要求されるように、既知の方法を用いて修飾される(例えば、Sambrook et al. 1989、「分子クローニング、実験室マニュアル、第2版」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; およびAusubel et al. (1995)、「分子生物学における最新のプロトコル」、Greene Publishing Co., NY、を参照)。総細胞R N AもしくはポリAを富化したR N Aのハイブリダイゼーションを、任意の利用可能なフォーマットにおいて達成することができる。例えば、総細胞R N AもしくはポリAを富化したR N Aを固体支持体に貼り付け、そして固体支持体を、核酸分子の少なくとも一つもしくは一つの一部を含む少なくとも一つのプローブに、プローブが特異的にハイブリダイズする条件下で曝露する。これに代えて、配列の少なくとも一つ、もしくは一つの一部を含む核酸フラグメントを多孔性のガラ

40

50

スウエーハのような固体支持体に貼り付けることができる。次いで、ガラスウエーハを、サンプルからの総細胞RNAもしくはポリA RNAに、貼り付けた配列が特異的にハイブリダイズする条件下で、曝露することができる。例えば、Beattie (WO 95/11755号)に開示されているような、そのようなガラスウエーハおよびハイブリダイゼーション方法は、広く利用可能である。無処理の細胞集団からのおよび剤に曝露された細胞集団からのRNAサンプルに、与えられたプローブが特異的にハイブリダイズする能力を調べることにより、MTSP9ポリヌクレオチドをコード化する核酸の発現を上方もしくは下方調節するところの剤が同定される。

【0238】

一つのフォーマットにおいては、曝露されていない対照細胞集団と比較して、検査するべき剤に曝露された細胞集団との間でのタンパク質の相対量をアッセイすることができる(例えば、前立腺癌細胞株、肺癌細胞株、結腸癌細胞株もしくは乳癌細胞株)。このフォーマットにおいては、特異的抗体のような、プローブを使用して、異なる細胞集団もしくは体液中のタンパク質の差次的発現もしくは活性のレベルをモニターする。細胞株もしくは集団または体液を、検査すべき剤に適切な条件下および時間で曝露する。細胞溶解物または体液は、曝露された細胞株もしくは集団および対照、曝露されていない細胞株もしくは集団または曝露されていない体液から、調製することができる。次いで、細胞溶解物もしくは体液をプローブで分析する。

【0239】

例えば、MTSP9のNおよびC末端フラグメントをバクテリア中で発現させ、そしてこれらのフラグメントに結合するタンパク質を探索するために使用することができる。MTSP9のNもしくはC末端領域へのHis-タグまたはGST融合体のような融合タンパク質を、基質としての使用のために調製することができる。これらの融合タンパク質を、例えば、グルタチオン-セファロースビーズに結合させ、次いで、細胞溶解物もしくは体液を用いて探索することができる。溶解に先立って、MTSP9を調整できる候補剤、もしくはその上のドメインと相互作用するタンパク質で、細胞もしくは体液を処理することができる。融合タンパク質に結合した溶解物のタンパク質を、当分野において公知のように、SDS-PAGEで分離し、単離し、そしてタンパク質シーケンシングもしくは質量分析により同定することができる。

【0240】

抗体プローブは、もしそれらが十分な長さであれば(例えばMTSP9ポリペプチドの4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40個もしくはそれより多い連続したアミノ酸)、ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質を用いて、または、もし免疫原性を増強することが必要であれば、適当な担体と結合して、適切な免疫プロトコールにおいて、適当な哺乳動物宿主を免疫にすることによって調製される。ウシ血清アルブミン(BSA)、スカシガイのヘモシアニン(KLH)のような担体、もしくは他の担体タンパク質との免疫原性結合体を調製するための方法は、当分野において周知である。或る状況では、直接的な結合、例えばカルボジイミド試薬を使用する結合が有効であり得る；他の場合には、Pierce Chemical Co., Rockford, ILにより提供されるような結合試薬がハプテンへの接触性を提供するために望ましい。ハプテンペプチドは、Cys残基を用いてアミノもしくはカルボキシ末端のいずれかで伸長するか、もしくは、例えば、担体への結合を容易にするためにシステイン残基を挿入することができる。免疫原の投与は、当分野において一般的に理解されるように、適当な期間に亘って、そして適当なアジュバントを使用して注射により、一般的には行われる。免疫スケジュールの間、抗体生成の適切さを測定するために抗体の力価を調べる。

【0241】

抗ペプチド抗体を、例えば、MTSP9のカルボキシ末端アミノ酸に相当する合成ペプチドを用いて生成することができる。合成ペプチドは、1〜3個のアミノ酸の長さ、一般的には少なくとも4個もしくはそれ以上のアミノ酸残基の長さ、ほどに小さくあり得る。ペプチドを、標準的な方法を用いてKLHに結合させ、そしてウサギもしくは有蹄動物のよ

10

20

30

40

50

うな動物に免疫することができる。次いで、ポリクローナル抗体を、例えば、共有結合したペプチドを含有するActigelビーズを用いて精製することができる。

【0242】

この方法で生産されたポリクローナル抗血清は、或る応用のためには申し分ない一方で、医薬組成物のためにはモノクローナル製品が、一般的には使用される。所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株を、一般的に公知のように、リンパ球もしくは脾臓細胞の不死化に影響を及ぼすKohler et al., (Nature 256: 495-7 (1975))の標準的方法または変形方法を用いて調製することができる。所望の抗体を分泌する不死化細胞株は、抗原がペプチドハプテン、ポリペプチドもしくはタンパク質である、イムノアッセイによりスクリーニングされる。所望の抗体を分泌する適切な不死化培養細胞が同定されるときには、細胞を、インビトロもしくは、腹水を介するインビボの生産によるかのどちらかで培養する。特に興味深いのは、MTSP9の触媒ドメインもしくは活性化切断部位(領域)を認識する、モノクローナル抗体である。

10

【0243】

これに加えて、MTSP9のチモーゲンもしくは2本鎖型を用いて、コンホーメーションエピトープを認識するモノクローナル抗体を作成することができる。次いで、所望のモノクローナル抗体を、培養上清み液もしくは腹水上清み液から回収する。免疫学的に有意な部分を含む、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗血清のフラグメントを、無傷の抗体と共に、アゴニストとして使用することができる。Fab、Fab'もしくはF(ab')₂のような免疫学的に反応性のフラグメントは、これらのフラグメントが一般的にはイムノグロブリン全体よりも免疫原性が少ないため、特に治療の場面において、しばしば使用される。

20

【0244】

抗体もしくはフラグメントをまた、生産することができる。複数種の起源のキメラとの関連で、受容体の所望の領域に特異的に結合する領域をまた、生産することができる。上の方法でアッセイされる剤は、ランダムに選択され、もしくは合理的に選択され、またはデザインされることができる。

【0245】

剤は、例えば、ペプチド、低分子、および炭水化物であり得る。熟練者は、剤の構造的性質に制限がないことを容易に認識するであろう。

30

剤は、当分野において公知のように、標準的な固相(もしくは液相)ペプチド合成法を用いて調製されることができる。加えて、これらのペプチドをコード化するDNAを、市販のオリゴヌクレオチド合成機を用いて合成し、標準的な組換え生産システムを用いて組換え的に合成することができる。固相ペプチド合成を用いる生産は、遺伝子にコード化されないアミノ酸を含もうとするならば、必要となる。

【0246】

G. MTSP9ポリペプチドの少なくとも一つの活性を調整する試験物質のアッセイフォーマットおよび選択

MTSP9の少なくとも一つの活性を調節する剤を同定するための方法が提供される。方法としては、MTSP9の活性の変化を評価するための、ファージディスプレイおよび他の方法が挙げられる。そのような方法もしくはアッセイは、所望の活性をモニターしもしくは検出する任意の手段を使用することができる。スクリーニングアッセイを実施するための、種々のフォーマットおよび検出プロトコルが公知である。任意のそのようなフォーマットおよびプロトコルを、MTSP9ポリペプチド活性のモジュレーターを同定するために適合させることができる。以下は、例示的なプロトコルの議論を含む。

40

【0247】

1. ハイスループットスクリーニングアッセイ

単鎖MTSP9ポリペプチドをスクリーニングする場合、および／もしくは1回のアッセイで単一の試験物質をスクリーニングする場合には、上述のアッセイを実施することができるが、アッセイは典型的には、ハイスループットスクリーニングモードで実施され、即

50

ち複数の S P タンパク質に対してスクリーニングが行われ、そして／もしくは複数の試験化合物が同時にスクリーニングされる(一般的には、「ハイスループットスクリーニング：生物活性物質の発見」、(Devlin, Ed.) Marcel Dekker, 1997; Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1:384-91 (1997); and Silverman et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:397-403 (1998)を参照)。例えば、アッセイを、マルチウエル(例えば 24、48、96、384、1536 個のウエルもしくはさらに高密度)、チップまたはアレイフォーマットで行うことができる。

【0248】

ハイスループットスクリーニング(H T S)は、疾患標的に対する多数の様々な化学構造を試験して''ヒット''を同定する方法である(Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1:384-91 (1997))。現在の最先端の H T S 操作は、サンプル調製、アッセイ手順、およびそれに続く大量のデータのプロセッシングを取り扱うように高度に自動化されて、コンピュータ化されている。

【0249】

ハイスループットスクリーニングで使用される検出技術は、検討されている生化学的経路のタイプに依存する(Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1:384-91 (1997))。これらの方法としては、種々の酵素アッセイに適合させることができる、シンチレーション近接アッセイ(S P A)のような放射化学的方法(Lerner et al., J. Biomol. Screening, 1:135-143 (1996); Baker et al., Anal. Biochem., 239:20-24 (1996); Baum et al., Anal. Biochem., 237:129-134 (1996); and Sullivan et al., J. Biomol. Screening 2:19-23 (1997))、およびタンパク質-タンパク質相互作用アッセイ(Braunwalder et al., J. Biomol. Screening 1:23-26 (1996); Sonatore et al., Anal. Biochem. 240:289-297 (1996); and Chen et al., J. Biol. Chem. 271:25308-25315 (1996))、ならびに比色および発光検出法、共鳴エネルギー移動(R E T)法、時間分解蛍光(H T R F)法、蛍光共鳴エネルギー移動(F R E T)手順(例えば、Gonzalez et al., Biophys. J., 69:1272-1280 (1995)、を参照)のような細胞に基づく蛍光アッセイ、蛍光偏光もしくはアニソトロピー法(例えば、Jameson et al., Methods Enzymol. 246:283-300 (1995); Jolley, J. Biomol. Screening 1:33-38 (1996); Lynch et al., Anal. Biochem. 247:77-82 (1997)、を参照)、蛍光相関分光法(F C S)および他のそのような方法を含むが、それらに限定されない、非同位元素的検出方法、が挙げられる。

【0250】

2. 試験物質

M T S P 9 ポリペプチドの活性を調整する化合物を同定するために、低分子、抗体、タンパク質、核酸、ペプチドを含む試験化合物、ならびにそのライブラリーおよび収集物を、上述のアッセイおよび下記のアッセイでスクリーニングすることができる。コンピュータ化学に依存する合理的な薬物デザイン方法論を用いて、候補化合物をスクリーニングして、同定することができる。

スクリーニング法により同定される化合物は、拮抗物質を含む阻害剤を含み、そしてアゴニストであり得る。スクリーニングのための化合物としては、入手可能な、既知の、もしくは調製することのできる、任意の化合物および化合物の収集物が挙げられる。

【0251】

a. 化合物の選択

化合物を、セリンプロテアーゼ、特に M T S P 9 ポリペプチドの阻害のそれらの力価および選択性について、選択することができる。本明細書において説明したように、そして公知のように、標的セリンプロテアーゼおよびその基質を、プロテアーゼとその基質との反応を許容するアッセイ条件下で結合する。アッセイを、試験化合物の不在下で、そして増加する濃度の試験化合物の存在下で、実施する。セリンプロテアーゼ活性の 50 % が試験化合物により阻害される試験化合物の濃度が、その化合物の I C₅₀ 値(阻害濃度)もしくは E C₅₀ (有効濃度)値である。一連のもしくは一群の試験化合物群の中で、より低い I C₅₀ もしくは E C₅₀ 値を有するものが、より高い I C₅₀ もしくは E C₅₀ 値を有す

る化合物よりセリンプロテアーゼのより強力な阻害剤と考えられる。IC₅₀ 測定は、さらに単純なアッセイにしばしば使用されるが、一方では、EC₅₀ は、細胞を用いるアッセイのようなさらに複雑なアッセイにしばしば使用される。

【0252】

典型的には、候補化合物は、MTSP9ポリペプチド活性の阻害のためのインビトロアッセイにおいて測定したときに、100nM以下のIC₅₀ 値を有する。試験化合物はまた、セリンプロテアーゼに対する選択性について評価される。本明細書において説明されるように、そして一般的に公知のように、試験化合物を、セリンプロテアーゼおよび他の酵素のパネルに対するその力価についてアッセイし、それぞれのアッセイシステムにおいてIC₅₀ 値もしくはEC₅₀ 値をそれぞれの試験化合物について測定する。標的酵素、例えば、MTSP9ポリペプチド、に対して低いIC₅₀ 値もしくはEC₅₀ 値を示し、そして試験パネル中の他の酵素(例えばウロキナーゼ組織プラスミノゲン活性化因子、トロンビン、第Xa因子)に対してより高いIC₅₀ 値もしくはEC₅₀ 値を示すところの化合物は、標的酵素に対して選択的であると考えられる。一般的には、標的酵素アッセイにおけるIC₅₀ 値もしくはEC₅₀ 値が、酵素の選択性パネル中で測定された次に小さなIC₅₀ 値またはEC₅₀ 値よりも少なくとも1桁小さいならば、化合物は選択性であると見なされる。

10

【0253】

化合物はまた、インビボでそれらの活性を評価される。試験化合物の評価のために選択されるアッセイの種類は、化合物の使用により処置もしくは予防されるべき病態、ならびに試験化合物について評価されるべき投与経路に依存する。

20

【0254】

例えば、MTSP9ポリペプチドの阻害を通して腫瘍増殖を減少させる化合物の活性を評価するためには、PAI-1を評価するためにJankun et al., Canc. Res. 57:559-563 (1997)によって記載されている手順を使用することができる。略述すれば、ATCC細胞株DU145およびLnCaPをSCIDマウスに注射する。腫瘍が確立された後、化合物のインビトロの特性から決定された投与法にしたがって、試験化合物をマウスに与える。Jankun et al.化合物は水溶液で与えられた。腫瘍体積の測定を週2回、約5週間行う。適切な対照化合物の投与を受けた動物と比較して、化合物を投与された動物が減少した腫瘍体積を示したならば、化合物は活性と見なされる。

30

腫瘍体積の減少に対するブタプロテアーゼの阻害剤p-アミノベンズアミジンの作用を評価するためにデザインされたもう一つのインビボ実験モデルが、Billstroem et al., Int. J. Cancer 61:542-547 (1995)によって記載されている。

【0255】

化合物が転移の発生を減少させもしくは転移を阻害する能力を評価するために、Kobayashi et al. Int. J. Canc. 57:727-733d (1994)によって記載された手順を使用することができる。略述すれば、高い肺定着能について選択されたマウスの異種移植片を、C57BL/6マウスの中に静脈注射する(実験的転移)かもしくは腹壁の中に皮下注射する(自発的転移)。注射に先立って、検査すべき種々の濃度の化合物をマトリゲル中で混合することができる。腫瘍接種の1~6もしくは7~13日後のどちらかに試験化合物の連日腹腔内投与を行う。腫瘍接種の約3もしくは4週間後に動物を屠殺し、そして肺腫瘍の集落を計数する。得られたデータの評価は、試験化合物の効力、至適投与量および投与経路の決定を可能にする。

40

【0256】

腫瘍体積および転移の減少に対する試験化合物の活性を、それらの阻害剤を評価するためにRabbani et al., Int. J. Cancer 63:840-845 (1995)に記載されているモデルで評価することができる。そこでは、Mat Ly Lu腫瘍細胞が、コペンハーゲンラットの側腹部に注射された。種々の用量の試験化合物を3週間まで投与するために、浸透圧ミニポンプを動物に埋め込んだ。実験および対照動物の腫瘍重量ならびに体積、そして転移性増殖を実験中評価した。得られたデータの評価は、試験化合物の効力、至適投与量および投与

50

経路の決定を可能にする。これらの著者の幾人かは、関連プロトコールをXing et al., *Canc. Res.* 57:3585-3593 (1997)に記載した。

【0257】

化合物の抗血管新生活性を評価するために、ウサギ角膜血管新生モデルを使用することができる(例えばAvery et al. (1990) *Arch. Ophthalmol.*, 108:1474-147を参照)。Avery等はニュージーランドアルビノウサギの麻酔、次いで、中央角膜切開および放射状の角膜ポケットの形成を記載している。徐放性プロスタグランジンペレットをポケット内に置いて、新血管新生を誘導させた。試験化合物を5日間腹腔内投与し、5日目に動物を屠殺した。輪部について撮影した定期的な写真の観察により、試験化合物の効果を評価し、写真を用いて、新血管新生応答、それ故に、輪部血管新生の範囲を計算した。適切な対照と比較しての新血管新生の減少した範囲は、試験化合物が新血管新生を減少するかもしれないか

10

【0258】

血管形成の阻害における試験化合物の効果を評価するために使用される血管形成モデルは、Min et al. *Canc. Res.* 56:2428-2433 (1996)によって記載されている。C57BL6マウスは、血管形成誘導因子としてのbFGFを試験化合物と共にもしくは無しで含有するマトリゲル混合物の皮下注射を受ける。5日後に動物を屠殺し、そして新血管新生が視認できるところのマトリゲルプラグを写真撮影する。マトリゲルおよび有効用量の試験化合物の投与を受けた実験動物は、対照動物またはより少ないかもしれないかもしくは無効の量の化合物を投与された実験動物より少ない血管新生を示す。

20

【0259】

原発腫瘍の拡散を制限する能力について試験化合物を試験するためにデザインされたインビトロシステムが、Crowley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5021-5025 (1993)によって記載されている。CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)を発現するように工学操作された腫瘍細胞(PC3)を、ヌードマウスに注射する。腫瘍のサイズおよび／もしくは転移を減少させるそれらの活性について試験するための化合物を動物に投与し、そしてその後で腫瘍サイズならびに／または転移性増殖の測定を行う。加えて、種々の臓器中で検出されるCATのレベルは、試験化合物が転移を阻害する能力の指標を提供する；対照動物に対して処置動物の組織中のより少ないCATの検出は、より少ないCAT-発現細胞がその組織に移行したことを示す。

30

【0260】

高度に侵襲性であることが知られている腫瘍細胞株F3IIを用いる、試験セリンプロテアーゼ阻害剤の阻害能を評価するために、インビボ実験モデルがデザインされた(例えば、Alonso et al., *Breast Canc. Res. Treat.* 40:209-223 (1996)、を参照)。Alonsoは、毒性測定、腫瘍成長、侵襲性、自発的転移、実験的肺転移、および血管形成アッセイについてのインビトロの研究を記載している。

【0261】

L. Ossowskiにより1998に(*J. Cell Biol.* 107:2437-2445 (1998))最初に記載されたCAMモデル(ニワトリ胚絨毛尿膜モデル)は、試験化合物の阻害活性を評価するためのもう一つの方法を提供する。CAMモデルにおいては、腫瘍細胞は、CAMを含有する絨毛尿膜を通して侵入する(いくつかのセリンプロテアーゼ阻害剤の存在下での腫瘍細胞では、膜を通しての腫瘍細胞のより少ないかもしくは無い侵入をもたらす)。かくして、CAMアッセイは、種々の濃度の試験化合物の存在下および不在下に、CAMならびに腫瘍細胞により行われる。腫瘍細胞の侵襲性は、化合物の阻害活性の指標を提供するような条件下で測定される。阻害活性を有する化合物は、より少ない腫瘍侵入と相関する。

40

【0262】

CAMモデルはまた、血管形成(即ち、新しい血管の形成に対する作用)の標準的アッセイに使用される(Brooks et al. *Methods in Molecular Biology* 129:257-269 (1999))。このモデルにしたがえば、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)のような血管形成誘導因子を含有するフィルターディスクをCAM上に置く。CAM中へのサイトカインの拡散が局

50

所的な血管形成を誘導し、これを、フィルターディスク直下のCAM内の血管の分岐点の数を数えるような、いくつかの方法で測定することができる。同定された化合物がサイトカイン誘導性血管形成を阻害する活性を、この方法を用いて試験することができる。試験化合物は、血管形成誘導因子を含有するフィルターディスクに添加されるか、もしくは膜上に直接置かれるか、または全身的に投与されるかのいずれかである。試験化合物の存在および／もしくは不在下での新しい血管形成の程度を、このモデルを用いて比較することができる。試験物質の存在下におけるさらに少ない新しい血管の形成は、抗血管形成活性を示すであろう。MTSP9ポリペプチドの阻害剤に対する抗血管形成活性の実証は、そのSPタンパク質についての血管形成における役割を示す。

【0263】

b. 既知のセリンプロテアーゼ阻害剤

スクリーニングのための化合物は、MTSP9の活性を阻害するそれらの能力について試験することができる。スクリーニングアッセイにおける使用のための例示的なセリンプロテアーゼ阻害剤としては、セリンプロテアーゼ阻害剤3(SPI-3)(Chen, et al. *Cytokine*, 11:856-862 (1999)); アプロチニン(Iijima, R., et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 126:912-916 (1999)); Kazal型セリンプロテアーゼ阻害剤様タンパク質(Niimi, et al. *Eur. J. Biochem.*, 266:282-292 (1999)); Kunitz型セリンプロテアーゼ阻害剤(Ravichandran, S., et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 55:1814-1821 (1999)); 組織因子経路阻害因子-2/マトリックス関連セリンプロテアーゼ阻害剤(TFPI-2/MSPI)(Liu, Y. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 370:112-8 (1999)); Bukunin(Cui, C.Y. et al. *J. Invest. Dermatol.* 113:182-8 (1999)); メシル酸ナフモスタット(Ryo, R. et al. *Vox Sang.* 76:241-6 (1999)); TPCK(Huang et al. *Oncogene* 18:3431-3439 (1999)); 合成綿結合セリンプロテアーゼ阻害剤(Edwards et al. *Wound Repair Regen.* 7:106-18 (1999)); FUT-175(Sawada, M. et al. *Stroke* 30:644-50 (1999)); セリンプロテアーゼ阻害剤FUT-0175およびトロンボキサン合成酵素阻害剤OKY-046の組合せ(Kaminogo et al. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 38:704-8; 議論 708-9 (1998)); ラットセリンプロテアーゼ阻害剤2.1遺伝子(LeCam, A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253:311-4 (1998)); ラット脳下垂体中に発現される新規細胞内セリンプロテアーゼ阻害剤とグランザイムBとの複合体(Hill et al. *FEBS Lett.* 440:361-4 (1998)); 3,4-ジクロロイソクマリン(Hammed et al. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 219:132-7 (1998)); LEX-032(Bains et al. *Eur. J. Pharmacol.* 356:67-72 (1998)); N-トシル-L-フェニルアラニクロルメチルケトン(Dryjanski et al. *Biochemistry* 37:14151-6 (1998)); セリンプロテアーゼ阻害剤ニューロセルピン(P112)のマウス遺伝子(Berger et al. *Gene*, 214:25-33 (1998)); ラットセリンプロテアーゼ阻害剤2.3遺伝子(Paul et al. *Eur. J. Biochem.* 254:538-46 (1998)); エコチン(Yang et al. *J. Mol. Biol.* 279:945-57 (1998)); 14kDa植物関連セリンプロテアーゼ阻害剤(Roch et al. *Dev. Comp. Immunol.* 22(1):1-12 (1998)); マトリックス関連セリンプロテアーゼ阻害剤TFPI-2/33kDaMSPI(Rao et al. *Int. J. Cancer* 76:749-56 (1998)); ONO-3403(Hiwasaki et al. *Cancer Lett.* 126:221-5 (1998)); ブデラスタチン(Moser et al. *Eur. J. Biochem.* 253:212-20 (1998)); ブキニン(Xu et al. *J. Mol. Biol.* 276:955-66 (1998)); メシル酸ナフモスタット(Mellgren et al. *Thromb. Haemost.* 79:342-7 (1998)); 成長ホルモン依存性セリンプロテアーゼ阻害剤Spi-2.1(Maake et al. *Endocrinology* 138:5630-6 (1997)); Kunitz型セリンプロテアーゼ阻害剤である2型成長因子アクチベーター阻害剤(Kawaguchi et al. *J. Biol. Chem.*, 272:27558-64 (1997)); サバクトビバッタSchistocerca gregariaの卵巣由来の熱安定性セリンプロテアーゼ阻害剤タンパク質(Hamdaoui et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238:357-60 (1997)); Kunitz型プロテアーゼ阻害剤であるヒト胎盤幹細胞成長因子アクチベーター阻害剤(Shimomura et al. *J. Biol. Chem.* 272:6370-6 (1997)); 経口セリンプロテアーゼ阻害剤FUT-187(Shiozaki et al. *癌と化学療法*, 23(14): 1971-9 (1996)); 細胞外マトリックス

10

20

30

40

50

ス関連セリンプロテアーゼ阻害剤(M r 33,000, 31,000および27,000 (Rao, C.N., et al., Arch. Biochem. Biophys., 335:82-92 (1996)); 不可逆的イソクマリンセリンプロテアーゼ阻害剤(Palencia, D.D., et al., Biol. Reprod., 55:536-42 (1996)); フッ化4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニル(A E B S F) (Nakabo et al. J. Leukoc. Biol. 60:328-36 (1996)); ニューロセルピン(Osterwalder, T., et al., EMBO J. 15:2944-53 (1996)); ヒトセリンプロテアーゼ阻害剤であるアルファ-1-アンチトリプシン(Forney et al. J. Parasitol. 82:496-502 (1996)); ラットセリンプロテアーゼ阻害剤2.3(Simar-Blanchet, A.E., et al., Eur. J. Biochem., 236:638-48 (1996)); メシル酸ゲバキセート(parodi, F., et al., J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. 10:235-7 (1996)); 組換えセリンプロテアーゼ阻害剤C P T I I I (Stankiewicz, M., et al., (Acta Biochim. Pol., 43(3):525-9 (1996)); システイン富化セリンプロテアーゼ阻害剤(グアメリンII)(Kim, D.R., et al., J. Enzym. Inhib., 10:81-91 (1996)); ジイソプロピルフルオロホスフェート(Lundqvist, H., et al., Inflamm. Res., 44(12):510-7 (1995)); ネキシシン1(Yu, D.W., et al., J. Cell Sci., 108(Pt 12):3867-74 (1995)); L E X O 3 2 (Scalia, R., et al., Shock, 4(4):251-6 (1995)); プロテアーゼネキシシンI(Houenou, L.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92(3):895-9 (1995)); キマーゼ指向性セリンプロテアーゼ阻害剤(Woodard S.L., et al., J. Immunol., 153(11):5016-25 (1994)); N-アルファートシル-L-リジルークロロメチルケトン(T L C K)(Bourinbaiar, A.S., et al., Cell Immunol., 155(1):230-6 (1994)); S m p i 5 6 (Ghendler, Y., et al., Exp. Parasitol., 78(2):121-31 (1994)); Schistosoma haematobiumのセリンプロテアーゼ(Blanton, R.E., et al., Mol. Biochem. Parasitol., 63(1):1-11 (1994)); S p i - 1 (Warren, W.C., et al., Mol. Cell Endocrinol., 98(1):27-32 (1993)); T A M E (Jessop, J.J., et al., Inflammation, 17(5):613-31 (1993)); アンチトロンビンIII(Kalaria, R.N., et al., Am. J. Pathol., 143(3):886-93 (1993)); F O Y - 3 0 5 (Ohkoshi, M., et al., Anticancer Res., 13(4):963-6 (1993)); メシル酸カメオスタット(Senda, S., et al., Intern. Med., 32(4):350-4 (1993)); 色素上皮由来因子(Steele, F.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90(4):1526-30 (1993)); アンチスタチン(Holstein, T.W., et al., FEBS Lett., 309(3):288-92 (1992)); ワクシニアウイルスK 2 L遺伝子がセリンプロテアーゼ阻害剤をコード化する(Zhou, J., et al., Virology, 189(2):678-86 (1992)); Bowman-Birkセリンプロテアーゼ阻害剤(Werner, M.H., et al., J. Mol. Biol., 225(3):873-89 (1992)); F U T - 1 7 5 (Yanamoto, H., et al., Neurosurgery, 30(3):358-63 (1992)); F U T - 1 7 5 (Yanamoto, H., et al., Neurosurgery, 30(3):351-6, 議論 356-7 (1992)); P A I - I (Yreadwell, B.V., et al., J. Orthop. Res., 9(3):309-16 (1991)); 3,4-ジクロロイソクマリン(Rusbridge, N.M., et al., FEBS Lett., 268(1):133-6 (1990)); アルファ-1-アンチキモトリプシン(Lindmark, B.E., et al., Am. Rev. Respir. Dis., 141(4 Pt 1):884-8 (1990)); P-トルエンスルホニル-L-アルギニンメチルエステル(T A M E)(Scuderi, P., J. Immunol., 143(1):168-73 (1989)); アルファ-1-アンチキモトリプシン(Abraham, C.R., et al., Cell, 52(4):487-501 (1988)); コントラプシン(Modha, J., et al., Parasitology, 96 (Pt 1):99-109 (1988)); アルファ-2-アンチプラスミン(Holmes, W.E., et al., J. Biol. Chem., 262(4):1659-64 (1987)); 3,4-ジクロロイソクマリン(Harper, J.W., et al., Biochemistry, 24(8):1831-41 (1985)); ジイソプロピルフルオロホスフェート(Tsutsui, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 123(1):271-7 (1984)); メシル酸ガベキセート(Hesse, B., et al., Pharmacol. Res. Commun., 16(7):637-45 (1984)); フッ化フェニルメチルスルホニル(Dufer, J., et al., Scand. J. Haematol., 32(1):25-32 (1984)); プロテアーゼ阻害剤C I - 2 (McPhalen, C.A., et al., J. Mol. Biol., 168(2):445-7 (1983)); フッ化フェニルメチルスルホニル(Sekar V., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 89(2):474-8 (1979)); P G E 1 (Feinstein, M.D., et al., Prostaglandine, 14(6):1075-93 (1977)、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0264】

c. コンビナトリアルライブラリーおよび他のライブラリー

スクリーニングアッセイのための化合物の供給源は、コンビナトリアルライブラリーを含むが、それらに限定されない、ライブラリーであり得る。コンビナトリアルライブラリーを合成するための方法およびそのようなコンビナトリアルライブラリーの特色は、当分野において公知である(一般的には、「コンビナトリアルライブラリー：合成、スクリーニングおよび応用可能性」、(Cortese Ed.) Walter de Gruyter, Inc., 1995; Tietze and Lieb, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2(3):363-71 (1998); Lam, *Anticancer Drug Des.*, 12(3):145-67 (1997); Blaney and Martin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1(1):54-9 (1997); and Schultz and Schultz, *Biotechnol. Prog.*, 12(6):729-43 (1996)、を参照)。

10

【0265】

種々のライブラリー、主としてペプチドおよびヌクレオチドに基づくオリゴマーライブラリー、を作成するための方法および戦略は、分子生物学的方法ならびに／もしくは同時化学合成の方法論を用いて開発されてきた(例えば、Dower et al., *Annu. Rep. Med. Chem.*, 26:271-280 (1991); Fodor et al., *Science*, 251:767-773 (1991); Jung et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31:367-383 (1992); Zuckerman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4505-4509 (1992); Scott et al., *Science*, 249:386-390 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); and Gallop et al., *J. Medicinal Chemistry*, 37:1233-1251 (1994)、を参照)。得られたコンビナトリアルライブラリーは、潜在的に数百万の化合物を含有しており、それを、選択された活性を示す化合物を同定するためにスクリーニングすることができる。

20

【0266】

ライブラリーは、大まかに次の3つのカテゴリーに分類される：ファージ粒子もしくはプラスミドから発現されたタンパク質の表面にランダムなペプチドまたはタンパク質が提示されている、融合タンパク質がディスプレイされるペプチドライブラリー；個別の化合物もしくは化合物の混合物がレジンビーズ(例えば、Lam et al., *Nature*, 354:82-84 (1991)、を参照)および綿の支持体(例えば、Eichler et al., *Biochemistry* 32:11035-11041 (1993)、を参照)のような、不溶性マトリックス上に提示される、支持体に結合された合成化学ライブラリー；ならびに化合物が溶液中で使用される方法(例えば、Houghten et al., *Nature*, 354:84-86 (1991); Houghten et al., *BioTechniques*, 313:412-421 (1992); and Scott et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:40-48 (1994)、を参照)、である。合成ペプチドおよびオリゴヌクレオチドのコンビナトリアルライブラリーの夥しい例があり、そして非ペプチド性有機低分子を含有するライブラリーを生産するための多数の方法がある。そのようなライブラリーは、種々の有機分子の混合物を形成するように組合せることができるものの、もしくは選択されたファルマコフォアモノマーに基づくライブラリーを形成するように組合せることができるものの、モノマーの基底セットに基づくことができる。

30

【0267】

ランダムなもしくは確定的なコンビナトリアルライブラリーのいずれかを、本明細書において開示され、そして／もしくはクレームされるスクリーニング法によってスクリーニングすることができる。これらの二つのライブラリーのいずれかにおいても、ライブラリーのそれぞれのユニットは、固体支持体上で単離されおよび／もしくは固定化される。確定的なライブラリーでは、それぞれの固体支持体上の特定のユニットの位置が予め判っている。ランダムライブラリーでは、それぞれの位置はやはり単一の独特のユニットを含有しているが、特定のユニットの位置は予め判っていない。ライブラリーを調製するための多数の方法が、当業者に周知である(例えば、Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998-4002 (1984), Houghten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5131-5135 (1985)、を参照)。スクリーニングのために、当業者に周知の任意の技法により作成されたコンビナトリアルライブラリーが意図される(例えば、スクリーニングについては、Sch

40

50

ultz and Schultz, *Biotechnol. Prog.*, 12(6):729-43 (1996)の表1、を参照); Bartel et al., *Science*, 261:1411-1418 (1993); Baumbach et al. *BioPharm*, (Can):24-35 (1992); Bock et al. *Nature*, 355:564-566 (1992); Borman, S., 「コンビナトリアルケミストは低分子の分子認識および自動化に焦点を当てる」、*Chem. Eng. News*, 2(12):29 (1996); Boublik, et al., 「真核生物ウイルスディスプレイ：ウイルス表面上に異種タンパク質を提示するためのAutographa California核多角体ウイルス(A C N P V)の主要表面糖タンパク質の工学操作」、*Bio/Technology*, 13:1079-1084 (1995); Brenner, et al., 「コード化されたコンビナトリアルケミストリー」、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5381-5383 (1992); Caflisch, et al., 「デノボリガンドデザインのためのコンピューターによるコンビナトリアルケミストリー：概観と評価、展望」、*Drug Discovery Des.*, 3:51-84 (1995); Cheng, et al., 「コード化されたコンビナトリアルライブラリーから選択された、ペプチド-A, B-トランスステロイド受容体と結合するスクアレン選択的ペプチド」、*J. Am. Chem. Soc.*, 118:1813-1814 (1996); Chu, et al., 「バンコマイシンに最も強固に結合する、ペプチドライブラリー中のペプチドを同定するためのアフィニティー毛細管電気泳動」、*J. Org. Chem.*, 58:648-652 (1993); Clackson, et al., 「ファージディスプレイライブラリーを用いて抗体フラグメントを作成」、*Nature*, 352:624-628 (1991); Combs, et al., 「タンパク質構造に基づくコンビナトリアルケミストリー：Src SH3に対する非ペプチド結合要素の発見」、*J. Am. Chem. Soc.*, 118:287-288 (1996); Cwirla, et al., 「ファージ上のペプチド：リガンドを同定するための莫大なペプチドのライブラリー」、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:6378-6382 (1990); Ecker, et al., 「コンビナトリアルな薬物の発見：どの方法が最大の価値を生み出すか」、*Bio/Technology*, 13:351-360 (1995); Ellington, et al., 「特異的なリガンドに結合するRNA分子のインビトロ選択」、*Nature*, 346:818-822 (1990); Ellman, J.A., 「ベンゾジアゼピンの突然変異体」、*J. Am. Chem. Soc.*, 114:10997 (1992); Erickson, et al., 「タンパク質」、Neurath, H., Hill, R.L., Eds.: Academic: New York, 1976; pp. 255-257; Felici, et al., *J. Mol. Biol.*, 222:301-310 (1991); Fodor, et al., 「光指向性、空間的にアドレス指定可能な並行化学合成」、*Science*, 251:767-773 (1991); Francisco, et al., 「E. Coli.の外側表面へのベータラクタマーゼの輸送と固着」、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:2713-2717 (1992); Georgiou, et al., 「グラム陰性細菌細胞表面の工学操作の実用的応用」、*TIBTECH*, 11:6-10 (1993); Geysen, et al., 「ウイルス抗原のエピトープを単一アミノ酸の分解能にまで調べるためのペプチド合成の使用」、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Glaser, et al., 「繊維状ファージベクターシステム中のコドンに基づく突然変異による抗体エンジニアリング」、*J. Immunol.*, 149:3903-3913 (1992); Gram, et al., 「未熟なコンビナトリアルイムノグロブリンライブラリーからの抗体のインビトロ選択および親和性成熟」、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:3576-3580 (1992); Han, et al., 「液相コンビナトリアル合成」、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:6419-6423 (1995); Hoogenboom, et al., 「繊維状ファージの表面上のマルチサブユニットタンパク質：抗体(Fab)重鎖および軽鎖をディスプレイするための方法論」、*Nucleic Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991); Houghten, et al., 「多数のペプチドの迅速固相合成のための一般的方法：個別のアミノ酸レベルでの抗原-抗体相互作用のための特異性」、*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:5131-5135 (1985); Houghten, et al., 「放射性受容体アッセイによるペプチドリガンドの決定のための合成ペプチドコンビナトリアルライブラリーの使用-オピオイドペプチド」、*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:405-412 (1993); Houghten, et al., 「基礎研究および薬物発見のための合成ペプチドコンビナトリアルライブラリーの作成および使用」、*Nature*, 354:84-86 (1991); Huang, et al., 「ランダム突然変異によるミオグロビン中の新規リガンド結合経路の発見」、*Nature Struct. Biol.*, 1:226-229 (1994); Huse, et al., 「ファージラムダにおけるイムノグロブリンレパトリーの大規模コンビナトリアルライブラリーの作成」、*Science*, 246:1275-1281 (1989); Janda, K.D., 「触媒抗体のデザインのための新しい戦略」、*Biotechnol. Prog.*, 6:178-181 (1990); Jung, et al., 「多重ペ

プチド合成法およびその応用」、Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 31:367-486 (1992); Kang, et al., 「ファージ表面に沿ってコンビナトリアル抗体 Fab ライブラリーを構築することによる認識および増幅機能の連結」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:4363-4366 (1991a); Kang, et al., 「ランダムなコンビナトリアルイムノグロブリンライブラリーからの鎖の混ぜ合わせによる抗体の再デザイン」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:11120-11123 (1991b); Kay, et al., 「選択された標的遺伝子に親和性を有する新規配列の供給源としての、ランダムな 38 アミノ酸ペプチドをディスプレイする M13 ファージライブラリー」、Gene, 128:59-65 (1993); Lam, et al., 「リガンド結合活性を同定するための、新しいタイプのペプチドライブラリー」、Nature, 354:82-84 (1991)(公表された正誤表が Nature, 358:434 (1992) および Nature, 360:768 (1992) に出ている); Lebl, et al., 「1 ピーズ 1 構造のコンビナトリアルライブラリー」、Biopolymers (Pept. Sci.), 37:177-198 (1995); Lerner, et al., 「免疫なしの抗体」、Science, 258:1313-1314 (1992); Li, et al., 「ペプチドホルモンの最小化」、Science, 270:1657-1660 (1995); Light, et al., 「繊維状ファージの主要コートタンパク質上における 2 量体の細菌アルカリ性ホスファターゼのディスプレイ」、Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:1073-1079 (1992); Little, et al., 「タンパク質およびペプチドの細胞表面提示：ファージテクノロジーに対する代替」、Trends Biotechnol., 11:3-5 (1993); Marks, et al., 「免疫を回避。ファージ上にディスプレイされた V 遺伝子ライブラリーからヒト抗体」、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Matthews, et al., 「基質ファージ：1 価ファージディスプレイによるプロテアーゼ基質の選択」、Science, 260:1113-1117 (1993); McCafferty, et al., 「ファージ酵素：バクテリオファージ上における機能性アルカリ性ホスファターゼの発現およびアフィニティークロマトグラフィー」、Protein Eng., 4:955-961 (1991); Menger, et al., 「コンビナトリアル有機化学により開発されたホスファターゼ触媒作用」、J. Org. Chem., 60:6666-6667 (1995); Nicolaou, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 34:2289-2291 (1995); Oldenburg, et al., 「ランダムペプチドライブラリーから単離された糖結合タンパク質に対するペプチドリガンド」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:5393-5397 (1992); Parmley, et al., 「抗体で選択可能な繊維状 fd ファージベクター：標的遺伝子のアフィニティー精製」、Genes, 73:305-318 (1988); Pinilla, et al., 「合成ペプチドコンビナトリアルライブラリー (SPCLS) — モノクローナル抗体 — 3E7 により認識されるベータエンドルフィンの抗原決定基の同定」、Gene, 128:71-76 (1993); Pinilla, et al., 「可溶性コンビナトリアルライブラリーの有用性に関する総説」、Biopolymers, 37:221-240 (1995); Pistor, et al., 「E. coli の表面上におけるウイルスヘムエグルチナン、Klin. Wochenschr., 66:110-116 (1989); Pollack, et al., 「抗体による選択的化学的触媒作用」、Science, 234:1570-1572 (1986); Rigler, et al., 「蛍光相関、単分子検出および大量スクリーニング：バイオテクノロジーにおける応用」、J. Biotechnol., 41:177-186 (1995); Sarvetnick, et al., 「生殖細胞系列の抗体レパトリーの化学的潜在能力を増大する」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:4008-4011 (1993); Sastry, et al., 「モノクローナル触媒抗体の作成のための、Escherichia Coli における免疫学的レパトリーのクローニング：重鎖可変領域特異的 cDNA ライブラリーの構築」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:5728-5732 (1989); Scott, et al., 「エピトープライブラリーによるペプチドリガンドの検索」、Science, 249:386-390 (1990); Sears, et al., 「生物有機化学的のために酵素を工学操作する：ペプチド結合の生成」、Biotechnol. Prog., 12:423-433 (1996); Simon, et al., 「ペプチド：医薬発見へのモジュール式アプローチ」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:9367-9371 (1992); Still, et al., 「コード化されたコンビナトリアルライブラリーを用いる、合成受容体による配列選択的ペプチド結合の発見」、Acc. Chem. Res., 29:155-163 (1996); Thompson, et al., 「低分子ライブラリーの合成および応用」、Chem. Rev., 96:555-600 (1996); Tramontano, et al., 「触媒抗体」、Science, 234:1566-1570 (1986); Wrighton, et al., 「タンパク質ホルモンエリスロポエチンの強力なミメティックとしての小ペプチド」、Science, 273:458-464 (1996); York, et al., 「プラスミ

ノーゲンアクチベーター阻害剤 I 中の反応部位領域のコンビナトリアル突然変異誘発」、J. Biol. Chem., 266:8595-8600 (1991); Zebedee, et al., 「B型肝炎ウイルス表面抗原に対するヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:3175-3179 (1992); Zuckerman, et al., 「ロボット合成により生成された等モルのペプチド混合物からアフィニティー選択による最大親和性リガンドの同定」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:4505-4509 (1992)。

【0268】

例えば、MTSP9ポリペプチドもしくはSPタンパク質のプロテアーゼドメインに結合するペプチドを、ファージディスプレイライブラリーを用いて同定することができる。例示的实施態様では、この方法は、a)ファージライブラリーからのファージをMTSP9ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインと接触させること；(b)タンパク質に結合するファージを単離すること；そして(c)単離されたファージによりコード化される少なくとも一つのペプチドの正体を決定して、MTSP9ポリペプチドに結合するペプチドを同定すること、を含む。

10

【0269】

H. MTSP9ポリペプチドの活性のモジュレーター

MTSP9ポリペプチドもしくはプロテアーゼドメインを用いて、他のスクリーニング法でスクリーニングにより同定された、もしくは生産された、MTSP9の活性を調整する化合物が、本明細書において提供される。これらの化合物は、MTSP9ポリペプチドと直接相互作用することにより、またはその転写もしくは翻訳を変化させることにより、作用する。そのような分子としては、MTSP9ポリペプチドと、特にそのプロテアーゼドメインと、特異的に反応する抗体、MTSP9ポリペプチドの発現を変化させるところのアンチセンス核酸もしくはRNAiのような二重鎖RNA(dsRNA)、抗体、ペプチドミメティックおよび他のそのような抗体、が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0270】

1. 抗体

本明細書において提供されるMTSP9ポリペプチド、特にその単鎖プロテアーゼドメイン、もしくは完全長の活性化型、またはプロテアーゼドメイン、またはチモーゲン型に特異的に結合する、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む抗体が提供される。

【0271】

一般的には抗体は、モノクローナル抗体であって、典型的には抗体は、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインに特異的に結合する。特別な実施態様では、MTSP9の単鎖もしくは2本鎖型のプロテアーゼドメインのそれぞれに対する抗体が提供される。また、MTSP9の任意のドメインおよびその2本鎖型に特異的に結合する抗体が提供される。

30

【0272】

MTSP9ポリペプチドならびにそのドメイン、フラグメント、同族体および誘導体を免疫原として使用して、そのような免疫原に特異的に結合する抗体を作成することができる。そのような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施態様では、ヒトMTSP9ポリペプチドに対する抗体が生産される。もう一つの実施態様では、フラグメントがセリンプロテアーゼドメインを含有するところのMTSP9ポリペプチドのフラグメントから生成した複合体が、抗体生産のための免疫原として使用される。

40

【0273】

MTSP9ポリペプチド、そのドメイン、誘導体、フラグメントもしくは類似体に対するポリクローナル抗体の生産のために、当分野において公知の種々の手順を使用することができる。抗体の生産のために、天然のMTSP9ポリペプチドもしくは合成物、または架橋したMTSP9ポリペプチドのような、前述の事項を注射することにより、種々の宿主動物を免疫することができる。そのような宿主動物としては、ウサギ、マウス、ラット等

50

が挙げられるが、これらに限定されない。宿主動物種に依存して免疫応答を増強するために、種々のアジュバントを使用することができて、そしてそれらとしては、フロイント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プロロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノール、ならびにカルメット-ゲラン杆菌(BCG)およびCorynebacterium parvumのような潜在的に有用なヒトアジュバント、が挙げられるが、それらに限定されない。

【0274】

MTSP9ポリペプチドまたはそのドメイン、誘導体、フラグメントもしくは類似体に対するモノクローナル抗体の調製のために、培地の中で連続細胞株培養による抗体分子の生産を提供するところの任意の技法を使用することができる。そのような技法としては、Kohler and Milstein (Nature 256:495-497 (1975))により始めに開発されたハイブリドーマ技法、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法(Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983))、およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのEBVハイブリドーマ技法(Cole et al., 「モノクローナル抗体および癌治療」中、Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))、が挙げられるが、それらに限定されない。さらに別な実施態様では、モノクローナル抗体を、無菌動物中で最近の技術を用いて生産することができる(PC T/米国特許第90/02545号)。ヒト抗体は用いられて、そしてヒトハイブリドーマを使用することにより(Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030 (1983))、もしくはインビトロでEBVでヒトB細胞を形質転換させることにより(Cole et al., 「モノクローナル抗体および癌治療」中、Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))、得られることができる。MTSP9ポリペプチドに特異的なマウスの抗体分子からの遺伝子を、適切な生物活性のヒト抗体分子からの遺伝子と一緒にスプライスすることによる、''キメラ抗体''の生産のために開発された技法(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985))を使用することができる。

【0275】

MTSP9をコード化する核酸分子もしくはその部分をDNA免疫プロトコールにおいて使用して、MTSP9に結合する抗体を生産することができる(例えば、米国特許第5,795,872号および米国特許第5,643,578号ならびに米国特許第6,337,072号、を参照)。

【0276】

単鎖抗体の生産のために記載されている技法(米国特許第4,946,778号)を、MTSP9ポリペプチド特異的単鎖抗体を生産するように適合させることができる。さらに別な実施態様は、Fab発現ライブラリーの構築について記載された技法(Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989))を使用して、MTSP9ポリペプチドまたはそのドメイン、誘導体、もしくは類似体に所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速で簡便な同定を可能にする。非ヒト抗体を、既知の方法(例えば、米国特許第5,225,539号、を参照)によって''ヒト化''することができる。

【0277】

MTSP9ポリペプチドもしくはそのエピトープに特異的に結合する抗体フラグメントを、当分野において公知の技法により生成することができる。例えば、そのようなフラグメントとしては、抗体分子のペプシン消化により生産することのできるF(ab')₂フラグメント; F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより作成することのできるFab'フラグメント、抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって生成されるFabフラグメント、ならびにFvフラグメント:が挙げられるが、それらに限定されない。

【0278】

抗体の生産において、所望の抗体のためのスクリーニングは、当分野において公知の技法、例えばELISA(酸素結合免疫吸着検査法)、によって達成される。MTSP9ポリペ

10

20

30

40

50

プチドの特定のドメインに対して特異的な抗体を選択するために、そのようなドメインを含有するMTSP9ポリペプチドのフラグメントに結合するところの生産物を求めて、生成されたハイブリドーマをスクリーニングことができる。

【0279】

上述の抗体は、MTSP9ポリペプチドタンパク質の局在化および／もしくは定量に関する、例えば、例えば診断方法における、これらのタンパク質の撮像、適切な生理学的サンプル中におけるそのレベルの測定について、当分野において公知の方法に使用されることができる。もう一つの実施態様では、抗MTSP9ポリペプチド抗体、もしくは結合ドメインを含有するそのフラグメントは治療薬として使用される。

【0280】

10

2. ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティック

SPタンパク質に結合して、活性を調整するところの分子を同定する方法が、本明細書において提供される。SP、特にそれらの単鎖プロテアーゼドメインもしくは触媒的に活性なフラグメント、に結合する分子の中には、環状ペプチドを含む、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックが含まれる。ペプチドミメティックとは、MTSP9ポリペプチドのような標的分子に特異的に結合するために必要な、リガンドもしくはポリペプチドの分子配座を模倣する分子もしくは化合物である。例示的な実施態様では、ペプチド、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックもしくはペプチドミメティックは、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインに結合する。そのようなペプチドおよびペプチドミメティックとしては、MTSP9ポリペプチドに特異的に結合し、典型的には、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインに結合するところの抗体のそれらが、挙げられる。本明細書において提供される方法によって同定されるペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックは、MTSP9ポリペプチドのアゴニストもしくはアンタゴニストであり得る。

20

【0281】

そのようなペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックは、哺乳動物においてMTSP9ポリペプチドと関連する疾患もしくは障害について、診断すること、処置すること、予防することおよびスクリーニングすることに有用である。加えて、ペプチドおよびペプチドミメティックは、MTSP9ポリペプチドの活性を調整するか、もしくはMTSP9ポリペプチド、一般的にはMTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメイン、に特異的に結合するところの分子または化合物を同定すること、単離すること、そして精製することに有用である。低分子量ペプチドおよびペプチドミメティックは、標的分子、例えば、MTSP9ポリペプチドもしくはMTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメイン、に強力に結合する性質を有することができる。

30

【0282】

本明細書において説明されるようなMTSP9ポリペプチドに結合する、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、MTSP9ポリペプチド活性を調整するために、ヒトを含む哺乳動物に、投与することができる。かくして、そのような活性を調整するために十分な量において、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチド模倣化合物を投与することを含む、新生物形成性疾患の療法的処置および予防のための方法が提供される。かくしてまた、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドの模倣化合物を、対象に治療的に有効な用量もしくは量で投与する、そのような疾患もしくは障害を持つ対象を処置する方法が、本明細書において提供される。

40

【0283】

ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを含有する組成物を、予防的および／もしくは治療的処置のために、投与することができる。治療的な適用においては、組成物を、上記のように、疾患にすでに罹患している患者に、疾患もしくはその合併症の症状を治癒するかもしくは少なくとも部分的に停止させるために十分な量で、投与することができる。この用途のための有効量は、疾患の重症度ならびに患者の体重および一般的状態に依存するであろうし、そして経験的に決定され得る。

50

【0284】

予防的な適用では、特定の疾患に罹りやすいかもしくはさもなければ危険性にある患者に、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを含む組成物を投与することができる。そのような量を、「予防的有効服用量」とであると定義する。この用途では、正確な量は、患者の健康状態および体重に再び依存する。したがって、MTSP9ポリペプチドに結合する、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを用いて、医薬担体もしくは希釈剤と共同で、少なくとも一つのペプチドもしくはペプチドミメティックを活性成分として含有する、医薬組成物を調製することができる。化合物を、例えば経口的、経肺的、非経口的(筋肉内、腹腔内、静脈内(IV)もしくは皮下の注射)、吸入(微細粉末製剤を介して)、経皮的、経鼻的、経腔的、経直腸的、または舌下のな投与経路によって投与することができて、そしてそれぞれの投与経路に適当な投与剤型で処方することができる(例えば、国際PCT出願第WO 93/25221号および第WO 94/17784号;ならびに欧州特許出願第613,683号、を参照)。

10

【0285】

MTSP9ポリペプチドに結合するところのペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックは、MTSP9ポリペプチドの生産に影響しそして影響されると考えられる多くの因子の評価を含む、MTSP9ポリペプチドの生物学的な役割を理解するための特有なツールとして、インビトロで有用である。また、そのようなペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックは、MTSP9ポリペプチドに結合しそしてその活性を調整する、他の化合物の開発において、かかる化合物がそのような開発を促進するにちがいないところの構造と活性相関についての重要な情報を提供するので、有用である。

20

【0286】

また、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックは、新規なMTSP9ポリペプチドもしくはMTSP9ポリペプチドアゴニストを求めてスクリーニングするためのアッセイにおいて、競合的結合剤として有用である。そのようなアッセイの実施態様では、化合物を修飾することなく使用することができるか、または種々の方式で;例えば、検出可能なシグナルを直接的もしくは間接的に提供するところの部分、共役結合的もしくは非共役結合的に接合するような標識化によって、修飾することができる。任意のこれらのアッセイにおいて、物質はそこへ直接的もしくは間接的に標識され得る。直接的標識化の可能性としては、以下のような標識基が挙げられる:ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼのような¹²⁵I酵素(米国特許第3,645,090号)のような放射性標識ならびに蛍光強度、波長シフトもしくは蛍光分極における変化をモニターする能力のある蛍光標識(米国特許第3,940,475号)である。間接的標識化の可能性としては、一つの構成要素のビオチン化に引き続いて上の標識基の一つにカップリングされたアビジンへ結合することが挙げられる。また、化合物は、化合物が固体支持体に付着されるはずである場合には、スパーサーもしくはリンカーを含むことができる。

30

【0287】

さらに、MTSP9ポリペプチドに結合するそれらの能力に基づいて、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、生存細胞、固定化された細胞中で、生体液中で、組織ホモジェネート中で、および精製された天然生体物質中で、MTSP9ポリペプチドを検出するための試薬として使用することができる。例えば、そのようなペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを標識することにより、MTSP9ポリペプチドを有する細胞を同定することができる。加えて、MTSP9ポリペプチドに結合するそれらの能力に基づいて、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、インシツ染色、FACS(蛍光標示式細胞分取)、ウェスタンブロッティング、ELISAおよび他の分析プロトコルで使用する。MTSP9ポリペプチドに結合するそれらの能力に基づいて、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、MTSP9ポリペプチドの精製において、もしくはMTSP9ポリペプチド、例えば、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインをコード化するポリペプチド、を発現する細胞の精製において、使用することができる。

40

50

【0288】

また、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、種々の医学的研究および診断的使用のための商業的試薬として使用することができる。ペプチドおよびペプチドミメティックの活性を、McDonald (1992) Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology, 14: 821に記載される多数のモデルの一つで、インビトロもしくはインビボのどちらかで評価することができる。

【0289】

3. ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティック治療
ペプチド類似体は、鑄型ペプチドの性質に類似した性質を持つ非ペプチド薬物として製薬産業で一般的に用いられる。これらのタイプの非ペプチド化合物は、''ペプチドミメティック''もしくは''ペプチド性ミメティック''(Luthman et al., A Textbook of Drug Design and Development, 14: 386406, 2nd Ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:16991720; Fauchere (1986) J. Adv. Drug Res., 15: 29; Veber and Freidinger (1985) TINS, p. 392; and Evans et al. (1987) J. Med. Chem. 30:1229)と呼称される。治療的に有用なペプチドに構造的に類似するところのペプチドミメティックを用いて、同等なもしくは強化された治療的または予防的効果を生成することができる。ペプチド性ミメティックの調製およびそれらの構造は、当業者に公知である。

【0290】

コンセンサス配列を持つ一つもしくはそれ以上のアミノ酸の、同型D-アミノ酸による系統的な置換(例えば、L-リジンの代わりにD-リジン)を用いて、より安定なペプチドを生成することができる。加えて、コンセンサス配列もしくは実質的に同等なコンセンサス配列変異を含む連結式ペプチドを、当分野において公知の方法(Rizo et al. (1992) An. Rev. Biochem., 61: 387、(出典明示により本明細書の一部とする))によって; 例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド橋を形成する能力のある内部システイン残基を付加することによって、生成することができる。

【0291】

当業者は、ペプチドの生物学的もしくは機能的活性に有害な影響を与えることなく、ペプチドもしくはミメティックに修飾を行い得ることを認識する。さらに、当業者は、標的分子、例えば、MTSP9ポリペプチドもしくは、一般的には、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメイン、に結合するところのペプチドを模倣する、三次元項での非ペプチド構造をデザインする仕方を承知しているであろう(例えば、Eck and Sprang (1989) J. Biol. Chem., 26: 17605-18795、を参照)。

【0292】

診断目的に用いるときには、ペプチドおよびペプチドミメティックを、検出可能な標識で標識し得て、したがってそのような標識のないペプチドおよびペプチドミメティックは、標識化されるペプチドおよびペプチドミメティックの調製において中間体として役立つ。検出可能な標識は、ペプチドおよびペプチドミメティックに共役結合的に結合されるとき、インビボ、例えば、ペプチドおよびペプチドミメティックが投与されている患者中で、もしくはインビトロ、例えば、試料もしくは細胞中で、ペプチドおよびペプチドミメティックの検出を許容するところの、分子もしくは化合物であり得る。適当な検出可能な標識は当分野において周知であり、そして、例として、放射性同位元素、蛍光標識(例えば、フルオレセイン)等が、挙げられる。使用される特定の検出可能な標識は、重大ではなくて、無毒性レベルで検出されるために選択される。そのような標識の選択は、当分野の技術内に十分にある。

【0293】

検出可能な標識のペプチドもしくはペプチドミメティックへの共役結合的な付着は、当分野において周知の従来の方法により、達成される。例えば、 ^{125}I 放射性同位元素を検出可能な標識として使用するとき、ペプチドもしくはペプチドミメティックへの ^{125}I の付着を、アミノ酸チロシンをペプチドもしくはペプチドミメティックへ組み込んで、そ

して次いでペプチドをヨウ素化することにより達成することができる(例えば、Weaner et al. (1994) Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, pp. 137140、を参照)。もしチロシンがペプチドもしくはペプチドミメティック中に存在しないならば、ペプチドもしくはペプチドミメティックのNもしくはC末端へのチロシンの組み込みを、周知の化学によって達成することができる。同様に、 ^{32}P を、例えば、従来の化学を使用してペプチドもしくはペプチドミメティック上の水酸基、を通してリン酸部分として、ペプチドまたはペプチドミメティック中に組み入れることができる。

【0294】

ペプチド性ミメティックの標識化は、普通、定量的構造-活性データおよび/もしくは分子モデルによって予測されるところの、ペプチドミメティック上の非-妨害位置への、直接的もしくはスパーサー(例えば、アミド基)を通した、一つもしくはそれ以上の標識の共役結合的な付着を伴う。一般的に、そのような非-妨害位置は、ペプチド性ミメティックが結合して治療効果を生成する、高分子との直接的接触を形成しない位置である。ペプチド性ミメティックの誘導体化(例えば、標識化)は、ペプチド性ミメティックの所望の生物学的もしくは薬理的活性を実質的に妨害してはならない。

10

【0295】

MTSP9ポリペプチドもしくはMTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインに結合するおよび/もしくはその活性を調整するか、またはMTSP9ポリペプチド活性を示すことができるところの、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、新生物形成性疾患の処置に用いることができる。ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、インビボもしくはエキスビボで、処置を必要とする対象の細胞に送達することができる。さらに、MTSP9ポリペプチド活性を有するペプチドを、インビボもしくはエキスビボで、MTSP9ポリペプチド遺伝子をコード化している突然変異体もしくは欠損対立遺伝子を保持しているところの細胞に、送達することができる。本明細書において説明されもしくは当業者に公知である任意の技法を、他のヒトタンパク質が実質的に存在しないところのそのようなペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックの調製、ならびにインビボもしくはエキスビボでの送達のために、用いることができる。例えば、微生物中での発現もしくはインビトロでの合成によって、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを容易に調製することができる。

20

【0296】

ペプチドまたはペプチドミメティックを、インビボもしくはエキスビボで、例えば、マイクロインジェクションによりまたは、リポソームを用いて、細胞中へ導入することができる。これに代えて、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックを、インビボもしくはエキスビボで、能動的にまたは拡散で、細胞により取り込ませることができる。加えて、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックの細胞外適用は、新生物形成性疾患の処置を効果的にするのに十分であり得る。1)MTSP9ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインに結合する；または、2)MTSP9ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインと類似の機能または活性を有する、ところの薬物もしくは有機化合物のような他の分子を、処置のための方法で用いることができる。

30

【0297】

4.合理的ドラッグデザイン

合理的ドラッグデザインの目標点は、例えば、それらのより活性なもしくは安定形態であるところの；または例えば、インビボでポリペプチド(例えば、MTSP9ポリペプチド)の機能を強化するもしくは妨害するところの、薬物を作り上げるために、生物学的に活性なポリペプチドもしくは興味のあるペプチドの、またはそれらが相互作用するところの小分子もしくはペプチドミメティック(例えば、アゴニストおよびアンタゴニスト)の構造類似体、を生産することである。一つのアプローチでは、最初に、興味のあるタンパク質(例えば、プロテアーゼドメインを有するMTSP9ポリペプチドもしくはポリペプチド)または、例えば、MTSP9ポリペプチド-リガンド複合体、の三次元構造を、X-線結晶解析、コンピューターモデリングもしくは、最も典型的には、アプローチの組合せ(例

40

50

えば、Erickson et al. 1990、を参照)により決定する。また、相同的なタンパク質の構造に基づくモデリングにより、ポリペプチドの構造に関する有用な情報を取得することができる。加えて、アラニン走査により、ペプチドを分析することができる。この技法では、アミノ酸残基をAlaで置換して、ペプチド活性へのその効果を測定する。ペプチドのそれぞれのアミノ酸残基を、この様式で分析して、ペプチドの重要な領域を決定する。

【0298】

また、MTSP9ポリペプチドに結合する、ポリペプチドもしくはペプチドまたは、一般的には、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインを、機能的アッセイにより選択して、次いでこのポリペプチドもしくはペプチドの結晶構造を決定することができる。ポリペプチドは、例えば、MTSP9ポリペプチドもしくはMTSP9ポリペプチドのタンパク質ドメインに対する特異的な抗体であり得る。このアプローチは、以後のドラッグデザインの基礎となり得る薬理活性団を与えることができる。さらに、抗イディオタイプのポリペプチドもしくはペプチド、(antibodies)を、MTSP9ポリペプチドもしくはMTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインに結合するところの機能的、薬理学的に活性なポリペプチドまたはペプチドに対して生成させることによって、結晶解析を完全に迂回することが可能である。鏡像の鏡像として、antibodiesの結合部位は、元の標的分子、例えば、MTSP9ポリペプチドもしくはMTSP9ポリペプチドを有するポリペプチド、の類似体であると予期される。次いで、antibodiesを用いて、化学的もしくは生物学的に生産されたペプチドのバンクのバンクからペプチドを同定し、単離することができる。次いで、選択されたペプチドは、薬理活性団として作用するであろう。

10

20

【0299】

かくして、例えば、改良された活性もしくは安定性を有するところの、またはMTSP9ポリペプチド活性のモジュレーター(例えば、阻害剤、アゴニストもしくはアンタゴニスト)として作用して、方法、特に新生物形成性疾患の診断、処置、予防およびスクリーニングのための方法、において有用であるところの薬物を、デザインすることができる。MTSP9ポリペプチドをコード化する核酸が入手可能なお陰で、X線結晶解析のような分析研究を実施するために十分な量のMTSP9ポリペプチドを、入手可能にすることができる。加えて、MTSP9ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメイン、例えば、配列番号：5および6のアミノ酸配列によってコード化されるプロテアーゼドメイン、のアミノ酸配列の知識が、X線結晶解析の代わりもしくはそれに加えた、コンピューターモデリング技法上の指針を提供することができる。

30

【0300】

MTSP9ポリペプチドに結合する、ペプチドおよびペプチドミメティックを同定する方法

本明細書において提供されるMTSP9ポリペプチド(例えば、MTSP9ポリペプチドもしくはMTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインを有するポリペプチド)に結合親和性を有するペプチドを、例えば、親和性強化法と組合わせたランダムなペプチド多様性発生システムによって、容易に同定することができる。特に、ランダムなペプチド多様性発生システムとしては、'プラスミド上のペプチド'システム(例えば、米国特許第5,270,170号および第5,338,665号、を参照)；'ファージ上のペプチド'システム(例えば、米国特許第6,121,238号およびCwiria, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 63786382、を参照)；'ポリソームシステム'；'コード化された合成的ライブラリー (ESL)'システム；ならびに'超大規模固定化ポリマー'システム(例えば、米国特許第6,121,238号；およびDower et al. (1991) An. Rep. Med. Chem. 26: 271280、を参照)が挙げられる。

40

【0301】

例えば、上記の手順を用いて、ランダムなペプチドを、通常規定された数のアミノ酸の長さ(例えば、12)を持つように、デザインすることができる。ランダムなペプチドをコード化するオリゴペプチドの収集を作成するためには、NがヌクレオチドA、C、GもしくはT(当モル；使用する方法論に依存する、他のヌクレオチドを使用することができる)で

50

あり、KがGもしくはTであり(当モル)、xはペプチド(例えば12)中のアミノ酸数に対応する整数である、コドンモチーフ(NNK)xを用いて、NNKモチーフから生じる32の可能なコドンの任意の一つ：それぞれの12個のアミノ酸に対して1個、それぞれの5個のアミノ酸に対して2個、それぞれの3個のアミノ酸に対して3個および三つの停止コドンのただ1個、を特定することができる。かくして、NNKモチーフはすべてのアミノ酸をコード化し、唯一の停止コドンをコード化し、そしてコドンのバイアスを減少する。

【0302】

ランダムなペプチドを、例えば、ファージ粒子の表面上に、ファージfd誘導体のpIIIもしくはpVIIコーティングタンパク質のどちらかを含む融合タンパク質の部分(ファージ上のペプチド)としてまたはプラスミドに結合したLacIペプチド融合タンパク質との融合タンパク質(プラスミド上のペプチド)としてのどちらかで、提示することができる。プロテアーゼドメインを有する固定化されたMTSP9ポリペプチドを用いる親和性強化法によって、ペプチドをコード化するDNAを含むファージもしくはプラスミドを同定しそして単離することができる。時には''パニング''と呼称される親和性強化法は典型的には、固定化されたMTSP9ポリペプチドを持つファージ、プラスミド、もしくはポリソームをインキュベートすること、MTSP9ポリペプチドに結合する、ファージ、プラスミド、もしくはポリソーム(付随するDNAもしくはmRNAとともに)を収集すること、およびより多くの収集されたファージもしくはプラスミド(付随するLacIペプチド融合タンパク質と共に)を生産すること、の多回の繰り返しを伴う。

【0303】

ペプチドおよびペプチドミメティックの特色

治療的適用のためのペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティックの中には、約250~約8,000ダルトンの分子量を有するものがある。もしそのようなペプチドが、親水性ポリマーによるオリゴマー化、もしくは二量体化および／もしくは誘導体化されるならば(例えば、化合物の親和性および／もしくは活性性を増大するために)、そのようなペプチドの分子量は、実質的にはより大きく成り得て、約500~約120,000ダルトンまで、通常、約8,000~約80,000ダルトンまでのどこかの範囲にあり得る。そのようなペプチドは、天然起源もしくは合成的(非天然起源)アミノ酸であるところの9個もしくはそれ以上のアミノ酸を含むことができる。当業者は、治療的および／もしくは診断的目的に適するペプチドおよびペプチドミメティックの親和性および分子量を決定することができる(例えば、Dower et al., 米国特許第6,121,238号、を参照)。

【0304】

ペプチドを、一つもしくはそれ以上の種々の親水性ポリマーに共役結合的に結合することができる。適当な親水性ポリマーとしては、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールによって例示されるポリアルキルエーテル、ポリ酢酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニールアルコール、ポリビニールピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体が、挙げられるが、それに限定されない。ペプチド化合物をそのようなポリマーで誘導化するとき、それらの安定性および循環半減期を、それらの結合活性を、もしあるとしても、殆ど減少することなく、増加させることができる。ペプチド化合物を二量体化して、その二量体サブユニットのそれぞれを親水性ポリマーに共有結合的に付着させることができる。ペプチド化合物をPEG化、即ちポリエチレングリコール(PEG)に共役結合的に付着させることができる。

【0305】

5. ペプチドおよびペプチドミメティックを調製する方法

MTSP9ポリペプチドに結合するペプチドを、当分野で公知な古典的方法により、例えば、標準的な固相技法を用いることにより、調製することができる。標準的な方法としては、完全固相合成、部分的固相合成法、フラグメント縮合、古典的溶液合成、および組換えDNA技法(例えば、Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc., 85: 2149(典明示により本明細書の一部とする)、を参照)によるものさえも、が挙げられる。

【0306】

''コードされた合成的ライブラリー''もしくは''超大規模固定化ポリマー合成''システム(例えば、米国特許第5,925,525号および第5,902,723号、を参照)を用いて、興味ある活性を持つ最少サイズのペプチドを決定することができる。加えて、所望のモチーフ(もしくはそのモチーフの最小サイズ)から1個、2個もしくはそれ以上の残基で異なるところのペプチドの群を形成するすべてのペプチドを調製することができる。次いで、このペプチドの収集物を、標的分子、例えば、MTSP9ポリペプチドもしくは、通常、MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメイン、に結合する能力に対しスクリーニングすることができる。また、この固定化ポリマー合成システムもしくは他のペプチド合成法を用いて、ペプチド化合物の先端切断類似体および欠失類似体ならびに先端切断類似体および欠失類似体の組合せを合成することができる。 10

【0307】

また、これらの手順を用いて、20個の天然起源の、遺伝的にコード化されたアミノ酸以外のアミノ酸が、ペプチドの一つ、二つもしくはそれ以上の位置で、置換されている、ペプチドを合成することができる。例えば、合成を促進する、ナフチルアラニンを、トリプトファンの代わりに置換することができる。ペプチド中へ置換することができる、他の合成的アミノ酸としては、L-ヒドロキシプロピル、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニル、L-d-ヒドロキシリジルおよびD-d-メチルアラニルのようなdアミノ酸、L- α -メチルアラニル、 β -アミノ酸ならびにイソキノリルが挙げられる。また、Dアミノ酸および非天然起源の合成的アミノ酸をペプチドに組み込むことができる(例えば、Roberts et al. (1983) Unusual Amino/Acids in Peptide Synthesis, 5(6):341-449、を参照)。 20

【0308】

また、リン酸化によって(例えば、W. Bannwarth et al. (1996) Biorganic and Medicinal Chemistry Letters, 6(17): 2141-2146、を参照)、およびペプチド誘導体を作製するための他の方法(例えば、Hruby et al. (1990) Biochem. J., 268(2): 249-262、を参照)によって、ペプチドを修飾することができる。かくして、ペプチド化合物は、類似のもしくは改良された生物活性を持つペプチドミメティックを調製するための基盤として、また役立つ。 30

【0309】

当業者は、種々の技法が対応するペプチド化合物と同様もしくは類似の所望の生物活性を持つ溶解度、安定性、ならびに加水分解およびタンパク分解に対する感受性に関してペプチドよりもより好ましい活性を持つ、ペプチドミメティックを構築するために利用可能であること、を認識する(例えば、Morgan et al. (1989) An. Rep. Med. Chem., 24:243-252、を参照)。N-末端アミノ基、C-末端カルボキシル基で修飾されたペプチドミメティックを調製し、および／もしくはペプチド中の一つもしくはそれ以上のアミド結合を非アミド結合に変更するための方法は、当業者に公知である。

【0310】

アミノ末端の修飾としては、アルキル化、アセチル化およびカルボベンゾイル基の付加、サクシンイミド基を形成すること(例えば、Murray et al. (1995) Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed., John Wiley and Sons, Inc., を参照)が挙げられるが、それらに限定されない。C-末端の修飾としては、C-末端カルボキシル基がエステルもしくはアミドによって置換される、ミメティックまたは環状ペプチドを形成する修飾が挙げられる。 40

【0311】

アミノ末端およびC-末端の修飾に加えて、ペプチドミメティックを含むペプチド化合物を、一つもしくはそれ以上の種々の親水性ポリマーによって、有益に、修飾するもしくはそれらに共有結合的にカップリングすることができる。ペプチド化合物を親水性ポリマーで誘導体化するときには、その溶解度および循環半減期を増強し、そしてそれらの免疫原性を、それらの結合親和性を、もしあっても、殆ど減少することなく、遮蔽すること 50

ができるということが見出されている。適当な非タンパク質様のポリマーとしては、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールによって例示されるポリアルキルエーテル、ポリ酢酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン、ポリビニールアルコール、ポリビニールピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体が挙げられるが、それらに限定されない。通常、そのような親水性ポリマーは、約2,000～約40,000ダルトンを含めて、約500～約100,000ダルトンおよび約5,000～約20,000ダルトンの範囲にある平均分子量を有する。また、親水性ポリマーは、約5,000ダルトン、10,000ダルトンおよび20,000ダルトンの平均分子量を有することができる。

【0312】

ペプチド化合物を誘導化するもしくはペプチドをそのようなポリマーにカップリングするための方法が記載されている(例えば、Zallipsky (1995) Bioconjugate Chem., 6: 150 165; Monfardini et al. (1995) Bioconjugate Chem., 6: 6269; 米国特許番号第4,640,835号; 米国特許番号第4,496,689号; 米国特許番号第4,301,144号; 米国特許番号第4,670,417号; 米国特許番号第4,791,192号; 米国特許番号第4,179,337号およびWO 95/34326(それらのすべてをその全体的な出典明示により本明細書の一部とする)を参照)

【0313】

ペプチド誘導体を作製する他の方法は、例えば、Hruby et al. (1990), Biochem J., 268 (2): 249262 (出典明示により本明細書の一部とする)、に記載されている。かくして、また、ペプチド化合物は、類似の生物活性を持つ非ペプチド化合物のための構造的モデルとして役立つ。当業者は、種々の技法が特定のペプチド化合物と同様もしくは類似の所望の生物活性を持つが、溶解度、安定性、加水分解およびタンパク分解に対する感受性に関してより好ましい活性を持つ化合物を構築するために利用可能であること、を認識する(例えば、Morgan et al. (1989) An. Rep. Med. Chem., 24: 243-252(出典明示により本明細書の一部とする)、を参照)。これらの技法としては、ペプチド主鎖を、ホスホネート、アミデート、カルバメート、スルホンアミド、二級アミン、およびN-メチルアミノ酸から成る主鎖で置換することが、挙げられる。

【0314】

ペプチド化合物は、システインのチオール基の間に分子内ジスルフィド結合を持つ環化形態で存在することができる。これに代えて、システインのチオール基の間に分子内ジスルフィド結合を形成して、二量体(もしくはより高級なオリゴ体の)化合物を与えることができる。また、一つもしくはそれ以上のシステイン残基をホモシステインで置換することができる。

【0315】

I. 結合体

a) M T S P 9 ポリペプチドの単鎖プロテアーゼドメイン(もしくはそれらのタンパク質分解的に活性な部分)または全長のチモーゲン、その活性形態、またはそれらの二本もしくは単鎖プロテアーゼドメイン; ならびに b) 直接的にもしくはリンカーを介して M T S P 9 ポリペプチドに結合されたターゲッティング剤であって、そこではその剤が: i) 結合体のアフィニティー単離もしくは精製; ii) 結合体の表面への付着; iii) 結合体の検出; または iv) 選択した組織もしくは細胞への目標を定めた送達を促進するところのもの、を含む結合体が、本明細書において提供される。結合体は、化学的結合体もしくはそれらの融合タンパク質混合物であり得る。

【0316】

ターゲッティング剤は、組織特異的もしくは腫瘍特異的なモノクローナル抗体または成長因子または M T S P 9 ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインに、直接的にもしくはリンカーを介するかのどちらかで結合するそのフラグメントのような、タンパク質またはペプチドフラグメント、であり得る。また、ターゲッティング剤は、タンパク質結合配列、核酸結合配列、脂質結合配列、多糖類結合配列もしくは金属結合配列、または固体

10

20

30

40

50

の支持体に付着するためのリンカーを含むところのタンパク質またはペプチドであり得る。特定の実施態様では、結合体は、a)本明細書において説明されるMTSP9もしくはその部分；およびb)直接的にもしくはリンカーを介してMTSP9ポリペプチドに結合されたターゲッティング剤を含む。

【0317】

例えば、MTSP9ポリペプチドドメインのアフィニティー単離もしくは精製、表面へのMTSP9ポリペプチドドメインの付着、またはMTSP9ポリペプチドドメインの検出、を促進するために機能するところのタンパク質もしくはペプチドフラグメント(もしくはそれらの複数)とMTSP9ポリペプチドとの、融合タンパク質および化学的結合体のような、結合体が提供される。結合体を、チオール結合を介するような化学的結合により生産することができて、そして組換え手段により融合タンパク質として生産することができる。融合タンパク質では、ペプチドもしくはそのフラグメントは、MTSP9ポリペプチドドメインのN-末端もしくはC-末端のどちらかに結合される。化学的結合体では、ペプチドもしくはそのフラグメントを、結合を効果的にすることができるところのどこかに結合し得て、そして単一のMTSP9ポリペプチドドメインもしくはその複数に結合されたそのようなペプチドもしくはフラグメントの複数があり得る。

10

【0318】

ターゲッティング剤は、細胞もしくは組織へのインビトロまたはインビボ送達のためであって、そして細胞もしくは組織特異的な抗体、成長因子、および特異的な細胞に発現された部分に結合するところの他の因子のような剤；ならびに結合されたタンパク質の指向した送達を促進するところの、細胞もしくは組織特異的な他の剤が、挙げられる。ターゲッティング剤は、細胞表面タンパク質との相互作用および結合体もしくはそのMTSP9ポリペプチド部分の内部移行によって、MTSP9ポリペプチドを、選択された細胞へ特異的に送達するものであり得る。

20

【0319】

これらの結合体は、種々の方法で用いられて、そして目標を定めた細胞もしくは組織に局在するかまたは近傍にいるところの特定のMTSPによる切断で、細胞毒性となるプロドラッグのような、プロドラッグを活性化する方法における使用に特に適している。プロドラッグは、結合体の以前に、もしくはそれと同時に、もしくはその以後に、投与される。目標を定めた細胞への送達に際して、プロテアーゼがプロドラッグを活性化し、それが次いで、細胞毒性のような、治療効果を示す。

30

【0320】

1. 結合

結合されたMTSP9ポリペプチドドメインとの結合体を、化学的結合、組換えDNA技法、もしくは組換え発現および化学的結合の組合せのいずれかによって調製することができる。MTSP9ポリペプチドドメインおよびターゲッティング剤を、任意の配向で結合することができて、二つ以上のターゲッティング剤および／もしくはMTSP9ポリペプチドドメインが、結合体中に存在することができる。

【0321】

a. 融合タンパク質

融合タンパク質が、本明細書において提供される。融合タンパク質は：a)MTSP9ポリペプチドの一つもしくは複数のドメイン、およびb)ターゲッティング剤、を含有する。一般的に、融合タンパク質は、融合タンパク質をコード化する核酸の組換え発現によって生産される。

40

【0322】

b. 化学的結合

本明細書において化学的結合を効果的にするために、MTSP9ポリペプチドドメインを、一つもしくはそれ以上の選択されたリンカーを介してもしくは直接的に、ターゲッティング剤に結合する。もし目標を定めた剤が、核酸もしくは非ペプチド薬物のような、ペプチドもしくはタンパク質以外であるならば、化学的結合を用いなければならない。選択

50

された部分を化学的に結合するための当業者に公知の任意の手段を用いることができる。

【0323】

2. リンカー

二つの目的でリンカーが、本明細書において意図される。結合体は、MTSP9ポリペプチド部分とターゲッティング剤の間に一つもしくはそれ以上のリンカーを含むことができる。これに加えて、ハイスループット固相スクリーニングプロトコールのためのような、マイクロタイタープレート、シリコンもしくはシリコンコーティングされたチップ、ガラスもしくはプラスチック支持体、のような個体支持体上へのMTSP9ポリペプチドもしくはその部分の固定化を促進するかもしくは増大させるために、リンカーを用いることができる。

10

結合体の調整のための、当業者に公知の任意のリンカーを、本明細書において用いることができる。典型的には、これらのリンカーを化学結合体の調製に使用することができる：ペプチドリナーを融合タンパク質に組み込むことができる。

【0324】

リンカーは、MTSP9ポリペプチドのドメインおよびターゲッティング剤を会合させるために適当な任意の部分であり得る。そのようなリンカーおよび結合としては、ペプチド結合、典型的には1〜約60個のアミノ酸、より一般的には約10〜30個のアミノ酸、を含むアミノ酸およびペプチド結合、ヘテロ二官能性の切断可能な交差リンカーのような化学的リンカーが挙げられるが、それに限定されないで、そこでは、化学的リンカーとしては、(4-ヨードアセチル)-アミノ安息香酸N-スクシンイミジル、(4-ヨードアセチル)-アミノ安息香酸スルホスクシンイミジルエステル、4-スクシンイミジルーオキシカルボニル-a-(2-ピリジルジチオ)トルエン、6-[a-メチルー-a-(ピリジルジチオ)-トルアミド]ヘキサン酸スルホスクシンイミジル、N-スクシンイミジルー3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオン酸、6[3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド]ヘキサン酸スクシンイミジルエステル、6[3-(2-ピリジルジチオ)-プロプリオンアミド]ヘキサン酸スルホスクシンイミジルエステル、3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオニルヒドラジド、Ellman試薬、ジクロロトリアジン酸、およびS-(2-チオピリジル)-L-システイン、を含むものが、挙げられるが、これらに限定されない。他のリンカーとしては、MTSP9ポリペプチドのドメインとターゲッティング剤との間の立体障害を減少するペプチドおよび他の部分、細胞内酵素基質、結合体の柔軟性を増加するリンカー、結合体の溶解度を増加するリンカー、結合体の血清安定性を増加するリンカー、光切断性リンカーならびに酸切断性リンカーが、挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0325】

化学的に結合された結合体に適当な、他の典型的なリンカーおよび結合としては、ジスルフィド結合、チオエステル結合、障害のかかったジスルフィド結合、ならびに、アミンおよびチオール基のような遊離した反応性基の間の共有結合が挙げられるが、これらに限定されない。これらの結合は、ポリペプチドの一方もしくは両者に反応性チオール基を生成するためにヘテロ二官能性試薬を用い、次いで、一つのポリペプチド上のチオール基を、反応性マレイニミド基もしくはチオール基が他のものの上でそれに付着され得るところの反応性のチオール基もしくはアミン基と反応させて、形成される。他のリンカーとしては、ビスマレイニミドエトキシプロパンのような酸切断性リンカー、酸不安定性ートランスフェリン結合体およびさらに酸性の細胞内区画中で切断されるであろうところのアジピン酸ジヒドラジド；UVもしくは可視光線への露出で切断するところの交差リンカー、ならびにヒトIgG₁の定常域からのC_H1、C_H2およびC_H3(Batra et al. Molecular Immunol., 30: 379-386 (1993)を参照)のような種々のドメインのようなリンカー、が挙げられる。或る実施態様では、それぞれのリンカーの所望の性質を利用するために、幾つかのリンカーを挙げるることができる。

40

【0326】

リンカーを共有結合的にカップリングさせることによって、化学的リンカーおよびペプチ

50

ドリンカーを、MTSP9ポリペプチドのドメインおよびターゲッティング剤に挿入することができる。下記のヘテロ二官能性剤を用いて、そのような共有結合的カップリングを効果的にすることができる。また、ペプチドリンカーは、リンカーおよび治療剤(TA)、リンカーおよび目標を定めた剤、もしくはリンカー、目標を定めた剤ならびに融合タンパク質としての治療剤(TA)、をコード化するDNAを発現することによって結合されることができる。また、結合体の溶解度を増加する柔軟なリンカーおよびリンカーは、単独もしくは他のリンカーと共にのどちらかでの使用のために本明細書において意図される。

【0327】

a)酸切断性、光切断性および熱感受性リンカー

MTSP9ポリペプチドのドメインを切断しそれがより容易に反応し易くなることを許容することが必要になり得る場合には特に、酸切断性リンカー、光切断性および熱感受性リンカーをまた用いることができる。酸切断性リンカーとしては、ビスマレイニイミドエトキシプロパン；アジピン酸ジヒドラジドリンカー(例えば、Fattom et al. (1992) *Infection & Immun.* 60: 584-589、を参照)および分子内トランスフェリン環化経路への参入を許容するに十分な部分のトランスフェリンを含むところの酸不安定性トランスフェリン結合体(例えば、Welhoener et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 4309-4314、を参照)、が挙げられるが、それらに限定されない。

【0328】

光切断性リンカーは、光に露出すると切断されるリンカーであって(例えば、(それらのリンカーを出典明示により本明細書の一部とする)、Goldmacher et al. (1992) *Bioconj. Chem.* 3:104-107、を参照)、それにより光に露出すると目標を定めた剤を放出する。光に露出すると切断する光切断性リンカーは、公知であって(例えば、システインのための光切断性保護基としてニトロベンジル基の使用を記載する、Hazum et al. (1981) in *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110；ヒドロキシプロピルメタアクリルアミド共重合体、グリシン共重合体、フルオレセイン共重合体およびメチルローダミン共重合体、を含む水溶性の光切断性共重合体を記載する、Yen et al. (1989) *Makromol. Chem* 190: 69-82；交差ーリンカーおよび近UV光(350nm)に露出すると光分解を受けるところの試薬を記載する、Goldmacher et al. (1992) *Bioconj. Chem.* 3: 104-107；ならびに光切断性結合を生成するところの塩化ニトロベンジルオキシカルボニル交差結合試薬を記載する、Senter et al. (1985) *Photochem. Photobiol* 42: 231-237、を参照)、それにより光に露出すると目標を定めた剤を放出する。そのようなリンカーは、光ファイバーを用いて光に露出され得るところの皮膚もしくは眼科的な異常の処置において、特別な用途を有するであろう。結合体の投与後に、目もしくは皮膚または他の身体部分を光に露出して、結合体から目標を定めた部分の放出を惹起することができる。そのような光切断性リンカーは、ターゲッティング剤を除去して、動物の身体からの急速な排泄を許容することが望ましいところの診断的なプロトコールと関連して有用である。

【0329】

b)化学的結合のための他のリンカー

他のリンカーとしては、トリチルリンカー、特に、種々の酸性度もしくはアルカリ性度での治療剤の放出に備えるところの結合体の属を生成するために誘導化されたトリチル基、が挙げられる。かくして、治療剤が放出されるところのpH範囲を、予め選択する能力によって与えられる柔軟性は、治療剤の送達を必要とする組織間の公知の生理学的差異に基づくリンカーの選択を、可能にする(例えば、米国特許番号第5,612,474号、を参照)。例えば、腫瘍組織の酸性度は、正常組織のものよりもより低いと思われる。

【0330】

c)ペプチドリンカー

リンカー部分は、ペプチドであり得る。融合タンパク質において、また化学的に結合された結合体において、ペプチドリンカーを使用することができる。典型的には、ペプチドは、約2～約60個のアミノ酸残基、例えば、約5～約40個の、もしくは約10～約30個のアミノ酸残基を有する。選択される長さは、そのためにリンカーが含まれるところの

用途のような因子に依存する。

【0331】

ペプチドリinkerは、ターゲッティング剤がタンパク質性であるときは有利である。例えば、リンカー部分は、単鎖抗体研究において公知なもののような、柔軟なスパーサーアミノ酸配列であり得る。このような公知のリンカー部分の例としては、 $(Gly_m Ser)_n$ および $(Ser_m Gly)_n$ (式中、 n は1～4および2～4を含む1～6であって、 m は1～4および2～4を含む1～6である)、のようなペプチド、酵素切断性リンカーならびに他のもの、が挙げられるが、それらに限定されない。

【0332】

さらに別な結合部分は、例えば、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5 10
879-5883, 1988; Whitlow, M., et al., Protein Engineering 6: 989-995, 1993; Newton et al., Biochemistry 35: 545-553, 1996; A. J. Cumber et al., Bioconj. Chem. 3: 397-401, 1992; Ladurner et al., J. Mol. Biol. 273: 330-337, 1997; および米国特許番号第4,894,443号、に記載されている。或る実施態様では、それぞれのリンカーの所望の性質を利用するために、幾らかのリンカーを含むことができる。

【0333】

3. ターゲッティング剤

結合体の検出、固定化もしくは精製を促進するところの任意の剤が、本明細書における使用のために意図される。化学的結合体については、そのような性質を有するところの任意の部分が意図される；融合タンパク質については、ターゲッティング剤は、タンパク質、 20
ペプチドもしくはターゲッティング活性を効果的にするに十分なところのそのフラグメントである。意図されるターゲッティング剤としては、MTSP9ポリペプチドもしくはその部分を、選択された細胞および組織に送達するところのものが挙げられる。そのような剤としては、腫瘍特異的モノクローナル抗体およびその部分、FGF、EGF、PDGF、VEGFのような成長因子、ケモカインを含むサイトカイン、ならびに他のそのような剤が挙げられる。

【0334】

4. 核酸、プラスミドおよび細胞

融合タンパク質をコード化する単離された核酸フラグメントが提供される。融合タンパク質をコード化するところの核酸フラグメントとしては：a) MTSP9ポリペプチドのプロテアーゼドメインをコード化する核酸；ならびにb) タンパク質、ペプチドまたはその有効なフラグメントをコード化する核酸が挙げられるが、それは：i) 融合タンパク質のアフィニティー単離もしくは精製；ii) 表面への融合タンパク質の結合；iii) 融合タンパク質の検出、を促進する。一般的には、核酸はDNAである。 30

【0335】

また、複製のためのプラスミドおよび上の核酸フラグメントを含むところの発現のためのベクターが提供される。また、プラスミドおよびベクターを含む細胞が提供される。細胞は、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞を含むが、それらに限定されない、任意の適当な宿主であり得る。本明細書において説明される任意のものを 40
含む当分野における公知の方法にしたがって、核酸、プラスミド、およびプラスミドを含む細胞を調製することができる。

【0336】

上の融合タンパク質を生産するための方法がまた、提供される。例示的な方法は、成長させること、例えば、それらが増殖するような細胞、融合タンパク質が細胞によって発現されるところの条件下で融合タンパク質をコード化するプラスミドを含む細胞、を培養すること、ならびに発現された融合タンパク質を回収すること、の工程を含む。組換えタンパク質を発現し、回収するための方法は、当分野において周知であり(一般的には、「分子生物学における最近のプロトコール」、(1998) § 16, John Wiley & Sons, Inc., を参照)そしてそのような方法を、発現された融合タンパク質を発現し、回収するために用いることができる。

【0337】

回収された融合タンパク質を、遠心分離、ろ過、クロマトグラフィー、電気泳動、免疫沈降、および他のそのような方法、のような当分野において公知の方法によって、もしくはそれらの組合せによって、単離するかもしくは精製することができる(一般的には、「分子生物学における最近のプロトコール」、(1998) § 16, John Wiley & Sons, Inc., を参照)。一般的には、回収された融合タンパク質は、タンパク質もしくは融合タンパク質のペプチドフラグメントおよび親和性結合部分との間の親和性結合を通して単離もしくは精製される。融合タンパク質の構築に関して上のセクションで考察したように、任意の親和性対を構築し、融合タンパク質の単離もしくは精製で用いることができる。例えば、親和性対は、タンパク質結合配列／タンパク質、DNA結合配列／DNA配列、RNA結合配列／RNA、脂質結合配列／脂質、多糖類結合配列／多糖類、もしくは金属結合配列／金属、であり得る。

10

【0338】

5. 固定化とそれらのための支持体もしくは基質

表面への結合のためにターゲティング剤がデザインされる、特定の実施態様では、イオンのもしくは共有結合的、非共有結合的または他の化学的相互作用のような結合によって、MTSP9ポリペプチドを支持体の表面もしくはマトリックス物質に付着させることができる。直接的にもしくはリンカーを介して、固定化を効果的にすることができる。シリコンチップ、ならびに本明細書において説明されて、当業者に公知の他の支持体を含むが、それらに限定されない、任意の適当な支持体の上に、MTSP9ポリペプチドを固定化することができる。複数のMTSP9ポリペプチドもしくはそれらのプロテアーゼドメインを、シリコンチップもしくはハイスループットのプロトコールおよびフォーマットで使用するための他のチップ、の表面上の結合体のアレイ(即ち、二つもしくはそれ以上のパターン)のような支持体に付着させることができる。

20

また、MTSP9ポリペプチドのドメインを、表面に直接的にもしくは結合されたターゲティング剤を持たないリンカーを介してそれに、結合することができることが注目される。したがって、MTSP9ポリペプチドのドメインの列を含んでいるチップ。

【0339】

本明細書において意図されるマトリックス物質もしくは固体支持体は、一般的に、リガンドおよび他の分子を固定化するための当業者に公知の任意の不溶性物質であって、多くの化学的合成および分離で使用するものである。そのような支持体は、例えば、アフィニティークロマトグラフィーで、生物活性物質の固定化で、およびタンパク質、アミノ酸および他の有機分子およびポリマーを含む生体分子の化学的合成の間で、用いられる。支持体の調製および用途は、当業者には周知である；多くのこのような物質およびそれらの公知の調製がある。例えば、アガロースおよびセルロースのような、天然起源の支持物質を、それらのそれぞれの起源から単離し、公知のプロトコールにしたがって処理することができて、そして合成的物質を公知のプロトコールにしたがって調製することができる。

30

【0340】

支持体は典型的には、固体、多孔性、可変性、もしくは硬性であるところの不溶性物質であり、そしてビーズ、ペレット、円盤、キャピラリー、中空構造繊維、針状、固体繊維、無秩序形状、薄フィルムおよび膜、を含むが、それらに限定されない、任意の要求される構造および形状を有する。かくして、品目は、マトリックス物質から加工され得るか、または表面のすべてもしくは部分をコーティングするかまたは粒子に含浸させることによるように、それと連結され得る。

40

【0341】

典型的には、マトリックスが粒状であるときには、粒子は少なくとも約10～2000 μmであるが、選択された応用に依存して、さらに小さくても大きくてもあり得る。マトリックスの選択は、少なくとも部分的には、溶解度、官能基、機械的安定性、表面積膨潤性、疎水的もしくは親水的性質および意図する用途のような、それらの物理的および化学的性質によって支配される。

50

【0342】

もし必要ならば、支持マトリックス物質を処理して、適当な反応性部分を含有することができる。或る場合においては、反応性部分を既に含有する支持マトリックス物質を、商業的に入手することができる。反応性部分を含有する支持マトリックス物質は、それによって、その上に分子が結合されるところのマトリックス支持体として役立ち得る。アミノシラン結合、ヒドロキシ結合もしくはカルボキシシラン結合のような反応性表面部分を含有する物質を、シラン化反応等を含む、よく確立された界面化学技法によって生産することができる。このような物質の例は、ガンマーアミノプロピルシランに共有結合的に結合された表面酸化ケイ素部分、ならびに他の有機部分；N-[3-(トリエトキシシリル)プロピル]フタラミン酸；およびビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノプロピルトリエトキシシラン、を有するものである。アミノ基反応性官能基を含有する容易に入手することができる物質の例示としては、パラアミノフェニルトリエトキシシランが挙げられるが、それに限定されない。また、誘導化されたポリスチレンおよび他のそのようなポリマーは周知であり、容易に当業者には利用可能である(例えば、Tentagel[商標登録]樹脂は多数の官能基について利用可能であり、Rapp Polymere, Tubingen, Germanyにより販売されている；米国特許第4,908,405号および米国特許第5,292,814号、を参照；また、Butz et al., Peptide Res., 7: 20-23 (1994)；ならびにKleine et al., Immunobiol., 190: 53-66 (1994)、を参照)。

10

【0343】

これらのマトリックス物質としては、興味のある分子を付着させるための支持マトリックスとして働き得るところの任意の物質が挙げられる。そのような物質は、当業者には公知であり、支持マトリックスとして用いられるものが挙げられる。これらの物質としては、無機物、天然ポリマーおよび、合成的ポリマーが挙げられるが、それらに限定されないで、それらとしては、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルおよびアクリルアミドの共重合体、ジビニルベンゼンと交差結合したポリスチレンおよび他のもの(Merrifield, Biochemistry, 3: 13851390 (1964)を参照)、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレン、デキストラン、ポリアクリルアミド、ゴム、シリコン、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、天然スポンジ、が挙げられるが、それらに限定されない。本明細書において特に興味があるものは、高多孔性ガラス(例えば、米国特許第4,244,721号、を参照)ならびにホウケイ酸塩、アルコールおよび水を混合することにより調製される他のものである。

20

30

【0344】

合成的な支持体としては、アクリルアミド、デキストラン誘導体およびデキストラン共重合体、アガロース-ポリアクリルアミド混合物、種々の官能基を持つ他のポリマーおよび共重合体、メタアクリル酸エステル誘導体および共重合体、ポリスチレンおよびポリスチレン共重合体(例えば、Merrifield, Biochemistry, 3: 13851390 (1964)；Berg et al., in Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap., Int. Symp., 1st, Epton, Roger (Ed), pp. 453459 (1990)；Berg et al., Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 20th, Jung, G. et al. (Eds), pp. 196-198 (1989)；Berg et al., J. Am. Chem. Soc., 111: 80248026 (1989)；Kent et al., Isr. J. Chem., 17: 243247 (1979)；Kent et al., J. Org. Chem., 43: 28452852 (1978)；Mitchell et al., Tetrahedron Lett., 42: 37953798 (1976)；米国特許第4,507,230号；米国特許第4,006,117号；および米国特許第5,389,449号を参照)、が挙げられるが、これらに限定されない。そのような物質としては、ポリビニルアルコールのようなポリマーおよび共重合体、ポリエチレン-共-アクリル酸、ポリエチレン-共-メタアクリル酸、ポリエチレン-共-エチルアクリル酸エステル、ポリエチレン-共-メチルアクリル酸エステル、ポリプロピレン-共-アクリル酸、ポリプロピレン-共-メチル-アクリル酸、ポリプロピレン-共-エチルアクリル酸エステル、ポリプロピレン-共-メチルアクリル酸エステル、ポリエチレン-共-ビニル酢酸エステル、ポリプロピレン-共-ビニル酢酸エステル、ポリエチレン-

40

50

共一無水マレイン酸のようなアクリル酸エステルおよびアクリル酸、から作製されるもの、ならびにポリプロピレンー共一無水マレイン酸のような酸無水物基を含むもの、が挙げられる。また、リソソームは、アフィニティー精製のための固体支持体として用いられている(Powell et al. Biotechnol. Bioeng., 33: 173 (1989))。

【0345】

多数の方法が、タンパク質および他の生体分子の固体もしくは液体支持体への固定化のために、開発されてきた(例えば、Methods in Enzymology, 44 (1976); Weetall, 「固定化された酵素、抗原、抗体およびペプチド」、(1975); Kennedy et al., 「固相生物学、分析的小および合成的概観」、Scouten, ed., pp. 253391 (1983)、を参照; 一般的には、「アフィニティー技法、酵素精製: 第B部」、Methods in Enzymology, Vol. 34, ed. W. B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. (1974); および「固定化した生化学物質およびアフィニティークロマトグラフィー」、Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 42, ed. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. (1974)、を参照)。

【0346】

最も普通に用いられる方法の中では、吸収および吸着または、直接的にもしくは、多数のジスルフィド結合、チオール結合、障害のかかったジスルフィド結合、アミンおよびチオール基のような遊離の反応性基間の共有結合のようなリンカーを介するか、のどちらかでの支持体への共有結合的結合であり、それらは当業者には公知である(例えば、試薬の調製および使用を記載し、そしてそのような試薬の商業的供給源を提供するところの、the PIERCE CATALOG, ImmunoTechnology Catalog & Handbook, 1992-1993; Wong, 「たんぱく質結合および架橋化の化学」、CRC Press (1993); また、光感受性リンカーを記載するところの、DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90: 6909 (1993); Zuckerman et al., J. Am. Chem. Soc., 114: 10646 (1992); Kurth et al., J. Am. Chem. Soc., 116: 2661 (1994); Ellman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91: 4708 (1994); Sucholeiki, Tetrahedron Lett., 35:7307 (1994); Su-Sun Wang, J. Org. Chem., 41: 3258 (1976); Padwa et al., J. Org. Chem., 41: 3550 (1976); およびVedejs et al., J. Org. Chem., 49:575 (1984)、を参照)。

【0347】

固定化を効果的にするために、タンパク質もしくは他の生体分子を含む組成物を、アルミナ、炭素、イオン交換樹脂、セルロース、ガラスもしくはセラミックのような支持物質と接触させる。フッ化炭素ポリマーは、生体分子を吸着によって付着させているところの支持体として使用されている(米国特許第3,843,443号; 公開国際PCT出願第WO/86 03840号)。

【0348】

J. 予後および診断

M T S P 9ポリペプチドタンパク質、ドメイン、類似体、およびそれらの誘導体、ならびにコード化する核酸(およびそれに相補的な配列)、ならびに抗M T S P 9ポリペプチド抗体を、診断法で、特に、肺、食道腫瘍のような頭部および頸部、前立腺、結腸、卵巣、子宮頸部、乳房および膀胱の癌の診断で、用いることができる。そのような分子をイムノアッセイのようなアッセイで用いて、M T S P 9ポリペプチド発現に影響する種々の異常、疾患、および障害を、検出し、予知し、診断し、もしくはモニターするか、またはそれらの治療をモニターすることができる。本明細書における目的のためには、体液もしくは腫瘍組織中のM T S P 9の存在が、特に興味を持たれる。

【0349】

特に、そのようなイムノアッセイを、患者由来の試料を特異的結合が起こるような条件下で抗M T S P 9ポリペプチド抗体と接触させること、および抗体によるいかなる特異的結合の量を検出するかもしくは測定することを含む方法によって、実施することができる。組織区画におけるそのような抗体の結合を使用して、異常なM T S P 9ポリペプチドの局在化もしくはM T S P 9ポリペプチドの異常な(例えば、増加した、減少したもしくは不在の)レベルを検出することができる。特定の実施態様では、M T S P 9ポリペプチドに

対する抗体を用いて、患者組織もしくは血清のような体液中で、試料を、MTSP9ポリペプチドの異常なレベルが疾患状態の指示となる、MTSP9ポリペプチドの存在についてアッセイすることができる。

【0350】

用いることができるイムノアッセイとしては、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検査法)、『サンドイッチ』イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体-結合アッセイ、イムノラジオメトリーアッセイ、蛍光イムノアッセイおよびタンパク質Aイムノアッセイのような、技法を用いる競合的および非競合的アッセイシステムが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0351】

相補的配列を含む、MTSP9ポリペプチド遺伝子ならびに関連する核酸配列および部分列をまた、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いることができる。MTSP9ポリペプチド核酸配列、または約少なくとも8個のヌクレオチド、一般的には14もしくは16または30個もしくはそれ以上の、一般的には1000個以下もしくは100個までの連続的なヌクレオチドを含むその部分列を、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。ハイブリダイゼーションアッセイを用いて、本明細書において説明されるように、MTSP9ポリペプチドの発現および／もしくは活性における異常な変化に関連する異常、障害、および疾患状態を検出し、予知し、診断するか、もしくはモニターすることができる。特に、そのようなハイブリダイゼーションアッセイは、核酸を含む試料をDNAもしくはRNAをコード化するMTSP9ポリペプチドにハイブリダズする能力のある核酸プローブと、そのようなハイブリダイゼーションが起こり得るような条件下で接触させること、および任意の得られたハイブリダイゼーションを検出するかもしくは測定することによる方法によって実施される。

20

【0352】

特定の実施態様では、対象由来の試料中におけるMTSP9ポリペプチドのDNA、RNA、タンパク質もしくは機能的活性のレベルを測定することにより、対象における異常なレベルのMTSP9ポリペプチドを検出することの特徴とする、疾患もしくは障害を診断する方法が、本明細書において提供されるが、そこでは、疾患もしくは障害を有しない類似の試料中に見出されるDNA、RNA、タンパク質または機能的活性のレベルと比べて、MTSP9ポリペプチドのDNA、RNA、タンパク質もしくは機能的活性のレベルの増加または減少が、対象における疾患もしくは障害の存在を示す。

30

【0353】

また、抗MTSP9ポリペプチド抗体および任意に、標識化されたその抗体への結合パートナーを一つもしくはそれ以上の容器中に含むところの診断的使用のためのキットが、提供される。これに代えて、抗MTSP9ポリペプチド抗体を標識化することができる(検出可能なマーカー、例えば、化学発光、酵素的、蛍光的、もしくは放射活性部分によって)。また、一つもしくはそれ以上の容器中で、MTSP9ポリペプチドをコード化する核酸にハイブリダズする能力のある核酸プローブを含むところのキットが、提供される。特定の実施態様では、キットは、一つもしくはそれ以上の容器中に、増幅をプライミングする能力のある[例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(例えば、Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CAを参照)、リガーゼ連鎖反応(EP 320,308を参照)、Q β レプリカーゼの使用、環状プローブ反応、もしくはMTSP9ポリペプチドをコード化する核酸の少なくとも一部分の適切な反応条件下で当分野で公知の他の方法によって]ところの一对のプライマー(例えば、それぞれ6~30個のヌクレオチドのサイズ範囲にある)を含むことができる。キットは、容器中に予め決められた量の精製されたMTSP9ポリペプチドもしくは核酸を、例えば、標準もしくは対照としての使用のために、さらに任意に含むことができる。

40

【0354】

K. 医薬組成物および投与形式

50

1. 組成物の成分

M T S P 9 ポリペプチドの活性を調整する、同定された化合物を含有する医薬組成物が、本明細書において提供される。また、M T S P 9 ポリペプチドの活性を調整するところの化合物および、化学療法化合物のような、新生物形成性障害の処置のためのさらに別な処置剤もしくは化合物との組合せが、本明細書において提供される。

【0355】

M T S P 9 ポリペプチドモジュレーターおよび抗腫瘍剤を、同時のもしくは逐次的または間欠的な投与のために、別個の組成物として包装することができる。これに代えて、それらを投与用の単一組成物として、もしくは単一組成物として投与するための二つの組成物として提供することができる。組成物はキットとして包装されることができる。

10

【0356】

a. M T S P 9 ポリペプチド阻害剤

単独もしくは他の化合物との組合せで用いるとき、本明細書において説明されるものを含めて、非所望のおよび／もしくは非制御の血管新生を含む、新生物形成性疾患に関連する臨床症状もしくは診断マーカーを軽減し、減少し、改善し、予防するか、または寛解の状態に置くかもしくは維持することのできる、任意のM T S P 9 ポリペプチド阻害剤を、本組合せで用いることができる。

【0357】

一つの実施態様では、M T S P 9 ポリペプチド阻害剤は、M T S P 9 ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインと特異的に反応するところの抗体もしくはそのフラグメント、M T S P 9 ポリペプチド生産の阻害剤、M T S P 9 ポリペプチド膜一局在化の阻害剤、またはM T S P 9 ポリペプチドの発現もしくは、特に、活性の任意の阻害剤である。

20

【0358】

b. 抗血管新生剤および抗腫瘍剤

単独もしくは他の化合物との組合せで用いるとき、本明細書において説明されるものを含めて、非所望のおよび／もしくは非制御の血管新生および／もしくは腫瘍成長および転移、特に固形新生物形成、血管奇形および心血管系障害、慢性炎症性疾患および異常創傷修復、循環系障害、c r e s t 症候群、皮膚障害、または眼障害に関連する臨床症状もしくは診断マーカーを軽減し、減少し、改善し、予防するか、または寛解の状態に置くかもしくは維持することのできる、任意の抗血管新生剤および抗腫瘍剤を、組合せで用いることができる。また、M T S P 9 ポリペプチドの阻害剤と組合せで使用するための抗腫瘍剤が意図される。

30

【0359】

c. 抗腫瘍剤および抗血管新生剤

本明細書において提供される方法によって同定されるかもしくは本明細書において提供される化合物を、抗腫瘍剤および／もしくは抗血管新生剤との組合せで用いることができる。

【0360】

2. 製剤および投与経路

本明細書の化合物および剤を、医薬組成物、典型的には、単一用量投与用に、処方することができる。製剤中の化合物の濃度は、投与において、意図する処置に有効であるところの量の送達に有効なものである。典型的には、組成物は、単一用量投与用に処方される。組成物を処方するためには、重量分の化合物もしくはその混合物を、処置される異常を軽減するかもしくは改善するような有効な濃度で、選択したビークル中に溶解し、懸濁し、分散するかまたはさもなければ混合する。本明細書において提供される化合物を投与するために適当な医薬担体もしくはビークルとしては、その特有の投与様式に対して適当であると当業者に公知である任意のそのような担体が挙げられる。

40

【0361】

加えて、化合物を、組成中の唯一の医薬活性成分として処方するか、もしくは他の活性成分と組合せることができる。組織に目標を定めたりポソームを含めて、リポソーム懸濁物

50

はまた、薬学的に許容される担体として適当であり得る。これらを、当業者に公知の方法にしたがって調製することができる。例えば、リポソーム製剤を、米国特許第4,522,811号に記載されるように調製することができる。

【0362】

活性化合物は、処置する患者において望ましくない副作用がなく治療的に有益な効果を表すのに十分な量で、薬学的に許容される担体中に含まれる。治療的に有効な濃度を、本明細書において提供するアッセイのような公知のインビトロおよびインビボシステムで化合物を試験することによって、経験的に決定することができる。

【0363】

薬の組成物中の活性化合物の濃度は、活性化合物の吸収、不活性化および排泄速度、化合物の物理化学的特性、投与スケジュール、ならびに投与量、ならびに当業者に公知の他の因子に依存する。 10

【0364】

典型的には、治療的に有効な投与量が意図される。投与される量は、血液容積当たり、約0.005~0.05 mg/ml および約0.01 mg/ml を含む、0.001~1 mg/ml の程度であり得る。医薬単回剤型を、単回剤型当たり必須活性成分もしくは必須成分の組合せの、約10 mg~約500 mg を含むおよび約25~75 mg を含む、約1 mg~約1000 mg、を与えるように調製する。正確な投与量を、経験的に決定することができる。

【0365】

活性成分は、一回で投与されるか、もしくは多数のより小さな投与用量に分割して時間間隔において投与され得る。正確な投与量および処置期間は、処置される疾患の関数であって、公知の試験プロトコルを用い経験的にまたはインビトロもしくはインビボの試験データから外挿によって決定されることができることが理解される。濃度および投与量の値はまた、軽減すべき異常の重症度によって変動し得ることは注目すべきである。任意の特定の対象に対して、特異的な投与レジメンを個人の必要性および組成物を投与するかもしれない投与を指導する人の専門的な判断にしたがって、経時的に調整すべきであること、ならびに本明細書に示される濃度範囲は単に例示的なものであって、クレイムされる組成物もしくはそれらを含む組合剤の範囲もしくは用途を、なんら限定するものではないことを、さらに理解すべきである。 20 30

【0366】

薬学的に許容される誘導体としては、酸、塩、エステル、水和物、溶媒和物およびプロドラッグ形態が挙げられる。典型的には、誘導体を、その薬物動態的性質が対応する中性化合物より優れているように選択する。

【0367】

かくして、一つもしくはそれ以上の、本明細書において提供される化合物もしくはその薬学的に許容される誘導体の有効濃度もしくは量を、全身的、局所的、もしくは局部的投与に適当な医薬担体もしくはビークルと混合して、医薬組成物を形成する。化合物は、処置が意図されるところの障害を改善するかもしれない処置するための有効量で含まれる。組成物中の活性化合物の濃度は、活性化合物の吸収、不活性化、排泄速度、投与スケジュール、投与量、特定の処方、ならびに当業者に公知の他の因子に依存する。 40

【0368】

非経口的、皮内的、皮下的もしくは局所的適用のために用いられる溶液もしくは懸濁液は、任意の以下の成分を含むことができる：注射用水、生理食塩溶液、脂肪油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールもしくは他の合成的溶媒のような無菌希釈剤；ベンジルアルコールおよびメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸および亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸(EDTA)のようなキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩およびリン酸塩のような緩衝剤；ならびに塩化ナトリウムもしくはデキストロースのような等張化剤である。非経口的製剤は、ガラス、プラスチックもしくは他の適当な物質製の、アンプル、使い捨て注射器または単回もしくは多回用 50

量バイアル中に封入されることができる。

【0369】

化合物が不十分な溶解度を示す例では、化合物を溶解するための方法を用いることができる。そのような方法は、当業者に公知であって、ジメチルスルホキシド(DMSO)のような共溶媒の使用、Tween[登録商標]のような界面活性剤の使用、もしくは炭酸水素ナトリウム水溶液への溶解が、挙げられるが、それらに限定されない。また、化合物のプロドラッグのような化合物の誘導体を、効果的な医薬組成物で処方するために用いることができる。眼科的適用のためには、化合物を眼科的に許容される担体中で処方する。本明細書における眼科的使用のためには、局所投与もしくは注射のどちらかによる、局所投与が意図される。徐放性製剤もまた望ましい。典型的には、組成物は、単回用量が有効量を投与するように、単回投与用に処方される。

10

【0370】

化合物のピークルとの混合もしくは添加に際して、得られる混合物は溶液、懸濁液、乳剤もしくは他の組成物であり得る。得られる混合物の形態は、意図する投与様式および選択した担体もしくはピークルにおける化合物の溶解度を含む、多数の因子に依存する。もし必要ならば、化合物の薬学的に許容される塩もしくは他の誘導体を調製する。

【0371】

化合物は、薬学的に許容される担体中に、処置する患者において望ましくない副作用がなく、治療的に有益な効果を示すのに十分な量で、含められる。副作用の数と程度は、そのために化合物が投与される場所の異常に依存することが、理解される。例えば、さらに低い予後の障害を処置するときには許容されないであろうところの特定の有害かつ望ましくない副作用は、生命にかかわるな病気を処置するときには許容される。

20

【0372】

また、化合物を、所望の作用を損なわない他の活性物質、もしくは当業者に公知の所望の作用を補助する場所の物質、と混合することができる。本明細書における用途のための化合物および剤の製剤としては、経口的、直腸的、局所的、吸入的、口腔的(例えば、舌下)、非経口的(例えば、皮下的、筋肉内、皮内もしくは静脈内)、経皮的な投与、または任意の経路に適するものが、挙げられる。任意の与えられた場合における最適な経路は、処置される異常の性質および重症度に、ならびに使用する特定の活性化合物の性質に依存する。製剤は、錠剤、カプセル、丸薬、粉末、顆粒、無菌の非経口的溶液もしくは懸濁液、および経口的溶液もしくは懸濁液、ならびに化合物もしくは薬学的に許容されるその誘導体の適当な量を含む油-水乳化液のような、単回剤型にて、ヒトおよび動物へ投与するために供与される。薬学的に治療的な化合物およびそれらの誘導体は、典型的には単回剤型もしくは多回剤型で処方されて、投与される。本明細書において用いられるように、単回剤型とは、ヒトおよび動物の対象に適当でありかつ当分野で公知であるように個別に包装される物理的に明確な単位をいう。

30

【0373】

それぞれの単回用量は、所望の治療効果を生成するのに十分な治療的活性化合物の予め決められた量を、必要とされた医薬担体、ピークルもしくは希釈剤と共同して含有する。単回剤型の例としては、アンプルおよび注射器、ならびに個別に包装された錠剤もしくはカプセルが、挙げられる。単回剤型は分画してもしくは多回で投与され得る。多回剤型は、区分された単回剤型で投与されるために、単一の容器中に包装された複数の同一な単回剤型である。多回剤型の例としては、バイアル、錠剤もしくはカプセルの瓶、またはポイントもしくはガロンの瓶が挙げられる。したがって、多回剤型は、包装では区分されないところの多数の単位用量である。

40

【0374】

組成物は、以下の活性成分と一緒に含有し得る：ラクトース、蔗糖、リン酸二カルシウムもしくはカルボキシメチルセルロースのような希釈剤；ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくはタルクのような滑沢剤；ならびにデンプン、アカシアゼラチンゴムの天然ゴム、ブドウ糖、糖蜜、ポリビニルピロリジン、セルロースおよびそ

50

の誘導体、ポビドン、クロスポビドンのような結合剤ならびに当業者に公知の他のそのような結合剤である。液体の薬学的に投与可能な組成物は、例えば、それによって溶液もしくは懸濁液を形成するように、上で定義される活性化合物および、任意の薬学的補助剤を、例えば、水、生理食塩液、水性デキストロース、グリセリン、グリコール、エタノール等のような担体中で、溶解し、分散し、もしくはそうでなければ混合することによって調製されることができる。

【0375】

もし所望されるならば、投与すべき医薬組成物はまた、湿潤剤、乳化剤、もしくは可溶化剤、pH緩衝剤等、例えば、酢酸塩、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、モノラウリン酸ソルビタンエステル、酢酸ナトリウムトリエタノールアミン、オレイン酸トリエタノールアミンおよび他のそのような剤のような、少量の非毒性補助物質を含有することができる。そのような剤型を調製する方法は、当業者には公知であるかもしくは明白であろう(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975、を参照)。投与すべき組成物もしくは製剤は、処置される対象の症状を軽減するに十分な量で、活性化合物の量含有する。

10

【0376】

非毒性担体から作り上げられる均衡でもって0.005%~100%の範囲で活性成分を含有する剤型もしくは組成物を調製することができる。経口投与に対しては、医薬組成物は、例えば、結合剤(例えば、 α 化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンもしくはヒドロキシプロピルメチルセルロース);増量剤(例えば、ラクトース、結晶セルロースもしくはリン酸水素カルシウム);滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクもしくはシリカ);崩壊剤(例えば、ジャガイモデンプンもしくはデンプングリコール酸エステルナトリウム);または湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)のような薬学的に許容される添加剤と共に、従来手段で調製される錠剤もしくはカプセルの形態を取り得る。錠剤を、当分野において周知の方法でコーティングすることができる。

20

【0377】

医薬製剤はまた、液体形態、例えば溶液、シロップもしくは懸濁液、であり得るし、または使用前に水もしくは他の適当なビークルで再構成するための原薬として提供され得る。そのような液体製剤を、懸濁剤(例えばソルビトールシロップ、セルロース誘導体もしくは硬化食用脂肪);乳化剤(例えば、レシチンもしくはアカシア);非水ビークル(例えば、アーモンド油、油状エステルもしくは分溜植物油);ならびに防腐剤(例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピルまたはソルビン酸)のような薬学的に許容される添加物と共に、従来手段で調製することができる。

30

【0378】

直腸投与に適当な製剤は、単回用量坐剤として提供され得る。これらを、活性化合物を一つもしくはそれ以上の従来固体担体、例えば、ココアバター、と混合し、次いで、生じた混合物を成形することによって、調製することができる。

【0379】

皮膚もしくは眼への局所適用に適当な製剤は、一般的には、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、噴霧剤、エアロゾルおよび油として処方される。使用することができる担体としては、ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコールおよびそれらの二つもしくはそれ以上の組合せが、挙げられる。局所製剤は、ヒドロキシメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ(アルキレングリコール)、ポリ/ヒドロキシアルキル、メタアクリル酸エステルもしくはポリメタアクリルアミドから選択される粘稠化剤の0.05~15重量パーセントを、さらに有利に含有し得る。局所製剤は、しばしば、滴注もしくは結膜サックに入れた軟膏として塗布される。それをまた、眼、顔洞および外耳道の洗浄もしくは潤滑に用いることができる。それをまた、前眼房および他の場所に注入することができる。液体状態の局所製剤をまた、そこから活性成分が放出される、細片、コンタクトレンズ等の形態で、親水性三元ポリマーマトリックス中で提供することができる。

40

50

【0380】

吸入による投与のためには、本明細書における用途のための化合物を、適当な噴射剤、例えば、二塩化二フッ化メタン、三塩化フッ化メタン、二塩化四フッ化エタン、二酸化炭素もしくは他の適当な気体、を用いて、加圧されたパックもしくはネブライザーからのエアロゾル噴霧提供の形態で、送達することができる。加圧されたエアロゾルの場合には、投与単位を、計量された量を送達すべきバルブを提供することによって、決定することができる。吸入器もしくは注入器で用いるための、例えば、ゼラチン、のカプセルおよびカートリッジを、化合物およびラクトースもしくはデンプンのような適当な粉末基盤の粉末混合物を含有して、処方することができる。

【0381】

口腔(舌下)投与に適当な製剤としては、例えば、風味をつけた基剤、通常は蔗糖およびアカシアもしくはトラガカント、中に、活性化合物を含有するトローチ剤；ならびに化合物を、ゼラチンおよびグリセリンもしくは蔗糖およびアカシアのような不活性基剤中に含む、香錠が挙げられる。

10

【0382】

化合物を、注射による、例えば大量注射もしくは連続注入による、非経口的投与のために処方することができる。注射用の製剤を、単回剤型で、例えば、アンプルもしくは多回用量容器中で、添加した防腐剤とともに提供することができる。組成物は、油性もしくは水性ビークル中の懸濁液、溶液もしくは乳濁液であって、懸濁化、安定化および／もしくは分散化の剤のような処方剤を含有し得る。これに代えて、活性成分は、使用前に適当なビークル、例えば、無菌でピロジェンフリーの水もしくは他の溶媒、で再構成するための粉末形態であり得る。

20

【0383】

経皮的投与に適する製剤を、長時間の期間の間、受容者の表皮と緊密に接触して保つために適合した、別個のパッチとして提供することができる。そのようなパッチは、活性化合物を、例えば、活性剤に関して0.1~0.2 M濃度の、任意に緩衝化された水溶液として適当に含有する。また、経皮的投与に適する製剤を電離療法(例えば、Pharmaceutical Research 3 (6), 318 (1986)、を参照)によって送達して、そして典型的には、活性化合物の任意に緩衝化された水溶液の形態を取ることができる。

【0384】

また、医薬組成物を、制御された放出手段および／もしくは送達装置(例えば、米国特許第3,536,809号；第3,598,123号；第3,630,200号；第3,845,770号；第3,847,770号；第3,916,899号；第4,008,719号；第4,687,610号；第4,769,027号；第5,059,595号；第5,073,543号；第5,120,548号；第5,354,566号；第5,591,767号；第5,639,476号；第5,674,533号および第5,733,566号を参照)により、投与することができる。

30

【0385】

所望の血中レベルを、血漿レベルによって確認されるように、活性剤の連続注入によって維持することができる。付き添いの医師は、毒性、または骨髄、肝臓もしくは腎臓機能不全により、投与量を少なくするために、治療を、停止し、中断し、もしくは調整する仕方および時期を承知しているであろうということは注目すべきである。逆に、付き添いの医師はまた、もし臨床応答が適切でないならば、処置をさらに高レベルに調整する仕方および時期を承知しているであろう(有害な副作用が起きないようにして)。

40

【0386】

また、単独もしくは他の剤との組合せにおける、MTSP9ポリペプチド阻害剤(複数を含む)の有効性および／もしくは毒性を、当分野において公知の方法によって評価することができる(一般的には、O'Reilly, Investigational New Drugs, 15: 5-13 (1997)、を参照)。

活性化合物もしくは薬学的に許容される誘導体を、徐放性製剤もしくはコーティングのよ

50

うな、身体からの急速な除去に対して化合物を保護するところの担体と共に調製することができる。

【0387】

組成物および／もしくは組合せを、その投与の指示書とともに含むキット、が提供される。キットは、その複合体を注射するための、典型的には無菌形態で包装された注射針もしくは注射器、および／もしくは包装されたアルコールパッドを、さらに含む得る。指示書は、臨床家もしくは患者による活性剤の投与のために、任意に含められる。

【0388】

最後に、化合物またはMTSP9ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメインまたは任意の先出の剤を含有する組成物を、包装材料、本明細書において意図される疾患もしくは障害の処置に有効であるところの本明細書において提供される化合物もしくはその適当な誘導体を包装材料内に、ならびに、化合物もしくはその適当な誘導体が本明細書において意図される疾患もしくは障害を処置するためであることを示すところのラベル、を含む製造品目として、包装することができる。ラベルは、それに対する治療が保証される障害を、任意に収録することができる。

10

【0389】

L. 処置方法

ヒトを含む動物、特に哺乳動物、における新生物形成性疾患を処置するかもしくは予防するために、本明細書において使用される方法によって確認される化合物が、本明細書において提供される。一つの実施態様では、方法は、哺乳動物への効果的な量のMTSP9ポリペプチドの阻害剤を投与することを含み、それによって疾患もしくは障害が処置されるかもしくは予防される。

20

【0390】

一つの実施態様では、処置もしくは予防において用いられるMTSP9ポリペプチド阻害剤を、薬学的に許容される担体もしくは添加剤とともに、投与する。処置される哺乳動物は、ヒトであり得る。本明細書において提供される阻害剤は、スクリーニングアッセイによって同定されるものである。加えて、抗体およびアンチセンス核酸、もしくはRNAiのような二重鎖RNA(dsRNA)が意図される。

【0391】

処置もしくは予防の方法は、MTSP9ポリペプチドの活性を阻害することが確認されている任意の化合物であり得るところのMTSP9ポリペプチド阻害剤と、同時に、以前にもしくは以後に、抗血管新生処置剤もしくは剤または抗腫瘍剤を投与することを、さらに含む得る。そのような化合物としては、小分子モジュレーター、抗体またはMTSP9ポリペプチドに対するその結合領域を含有するそのフラグメントもしくは誘導体、アンチセンス核酸または、MTSP9ポリペプチドの一部をコード化するかもしくはそれに相補的なRNAiのような、二重鎖RNA(dsRNA)、ならびにその中でMTSP9ポリペプチドをコード化する遺伝子の一部が異種の配列の側面にあつて、MTSP9ポリペプチドをコード化するゲノム遺伝子との異種の組換えを促進するところの、MTSP9ポリペプチドをコード化する遺伝子の少なくとも一部の生物活性を異種のヌクレオチド配列が不活性化するように、異種のヌクレオチド配列がそれに挿入されたところの、MTSP9ポリペプチドをコード化する遺伝子の一部を少なくとも含む核酸、が挙げられる。加えて、そのような分子は、一般的に、約1000nt長以下である。

30

40

【0392】

1. アンチセンス処置

特定の実施態様では、上記のように、新生物形成性疾患を処置するかもしくは予防するために、MTSP9ポリペプチドの機能は、MTSP9ポリペプチドアンチセンス核酸によって減少されるかもしくは阻害される。MTSP9ポリペプチドもしくはその部分をコード化する遺伝子またはcDNAに対してアンチセンスであるところの、少なくとも6個のヌクレオチド、一般的には約150個のヌクレオチドまで、の核酸の治療的もしくは予防的な用途、が提供される。本明細書において使用されるように、MTSP9ポリペプチド

50

''アンチセンス''核酸とは、何らかの配列相補性のお陰でおよび一般的に、高度の緊縮性条件下で、MTSP9ポリペプチドRNA(一般的に、はmRNA)の一部にハイブリダイズする能力のある核酸を指す。アンチセンス核酸は、MTSP9ポリペプチドmRNAのコード化および／もしくは非コード化領域に相補的であり得る。そのようなアンチセンス核酸は、MTSP9ポリペプチドの機能を減少するもしくは阻害するところの治療剤として有用性を有して、上記のような障害の処置もしくは予防に用いられることができる。

【0393】

MTSP9ポリペプチドアンチセンス核酸は、少なくとも6個のヌクレオチドを持っていて、そして一般的にはオリゴヌクレオチド(6~50個のヌクレオチドを含む6~約150個のヌクレオチドまでの範囲にある)である。アンチセンス核酸は、プロテアーゼドメインのすべてもしくは部分に相補的であり得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10個のヌクレオチド、少なくとも15個のヌクレオチド、少なくとも100個のヌクレオチド、もしくは少なくとも125個のヌクレオチド、である。オリゴヌクレオチドは、一本鎖もしくは二重鎖の、DNAもしくはRNAまたはキメラ混合物もしくは誘導体またはそれらの修飾されたもの、であり得る。オリゴヌクレオチドを、塩基部分、糖部分、もしくはリン酸主鎖で修飾することができる。オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付随する基、または細胞膜(例えば、Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556 (1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 648-652 (1987); PCT公開第WO 88/09810号、1988年12月15日公開、を参照)もしくは血液-脳関門(例えば、PCT公開第WO 89/10134号、1988年4月25日公開、を参照)を越えて通過を促進する剤、ハイブリダイゼーションを引き起こす切断剤(例えば、Krol et al., BioTechniques 6: 958-976 (1988)、を参照)、またはインターカレーション剤(例えば、Zon, Pharm. Res. 5: 539-549 (1988)、を参照)を含むことができる。

【0394】

MTSP9ポリペプチドアンチセンス核酸は、一般的にオリゴヌクレオチド、典型的には、一本鎖DNAもしくはRNAまたはその類似体もしくはそれらの混合物である。例えば、オリゴヌクレオチドとしては、ヒトMTSP9ポリペプチドをコード化するところの核酸の一部に対してアンチセンスである配列が挙げられる。オリゴヌクレオチドを、その構造上の任意の位置において、当分野において一般的に公知である置換基により修飾することができる。

【0395】

MTSP9ポリペプチドアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v), ワイブトキソシン、擬似ウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v), 5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリン、を含むが、これらに限定されない、群から選択されるところの、少なくとも一つの修飾された塩基部分を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0396】

もう一つの実施態様では、オリゴヌクレオチドは、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロースおよびヘキソースを含むが、それらに限定されない、群から選択される少なくとも一つの修飾された糖部分を含む。オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステルおよびホルムアセタールもしくはそれらの類似体から選択される、少なくとも一つの修飾されたホスフェート主鎖を含むことができる。

【0397】

オリゴヌクレオチドは、 α -アノマーオリゴヌクレオチドであり得る。 α -アノマーオリゴヌクレオチドは、鎖が互いに並行に走るところの相補的なRNAと特異的な二重鎖ハイブリッドを形成する(Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641 (1987))。 10

【0398】

オリゴヌクレオチドを、ペプチド、ハイブリダイゼーションを引き起こす交差-結合剤、輸送剤、ハイブリダイゼーションを引き起こす切断剤のような、しかしそれらに限定されない、他の分子に結合することができる。オリゴヌクレオチドを、当分野において公知の標準的な方法、例えば、自動化DNA合成機(Biosearch, Applied Biosystems等から商業的に入手可能であるような)の使用により、合成することができる。例として、Steinらの方法(Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988))によって、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを合成することができて、制御された多孔性ガラスポリマー支持体(Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451 (1988))の使用により、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドを調製することができる。 20

【0399】

特定の実施態様では、MTSP9ポリペプチドアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、触媒性RNAもしくはリボソーム(例えば、PCT国際公開WO 90/11364、1990年10月4日公開; Sarver et al., Science 247: 1222-1225 (1990)、を参照)が挙げられる。もう一つの実施態様では、オリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148 (1987))もしくはキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al., FEBS Lett. 215: 327-330 (1987))である。これに代えて、オリゴヌクレオチドは、RNAiのような二重鎖RNA(dsRNA)であり得る。 30

【0400】

さらに別の実施態様では、MTSP9ポリペプチドアンチセンス核酸は、外来性の配列からの転写によって細胞内で生産される。例えば、ベクターをそれが細胞によって取り込まれるようにインビボで導入することができて、その細胞内でベクターもしくはその一部が転写されて、アンチセンス核酸(RNA)を生産する。そのようなベクターは、MTSP9ポリペプチドアンチセンス核酸をコード化する配列を含むであろう。そのようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスRNAを生産することができる限り、エピソーム的なままであるかもしくは染色体的に統合されるように成ることができる。そのようなベクターを、本分野において標準的な組換えDNA技術方法によって構築することができる。ベクターは、哺乳動物細胞中での複製および発現に用いられるプラスミド、ビールス性、もしくは当分野で公知の他のものであり得る。そのようなプロモーターは、誘導的もしくは構成的でもあり得る。そのようなプロモーターとしては、SV40初期プロモーター領域(Bernoist and Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)、Rous肉腫ウイルスの3'長末端配列に含まれるプロモーター(Yamamoto et al., Cell 22: 787-797 (1980)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445 (1981)、メタロチオネイン遺伝子の制御配列(Brinster et al., Nature 296: 39-42 (1982)等、が挙げられるが、それらに限定されない。 40

【0401】

アンチセンス核酸としては、ヒトMTSP9ポリペプチド遺伝子を含む、MTSP9ポリペプチド遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部分に相補的な配列が挙げられる。絶対的 50

な相補性は要求されない。

新生物形成性疾患の処置もしくは予防において有効であるところのMTSP9ポリペプチドアンチセンス核酸の量は、疾患の性質に依存して、標準的な臨床技法によって経験的に決定され得る。可能などころでは、アンチセンス細胞毒性を、細胞中インビトロで次いで、ヒトでの試験および使用に先立って有用な動物モデルシステムで測定することが望ましい。

【0402】

2. RNA干渉

RNA干渉(RNAi)(例えば、Chuang et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4985、を参照)を使用して、MTSP9をコード化する遺伝子の発現を阻害することができる。干渉性RNA(RNAi)フラグメント、特に二重鎖(ds)RNAi、を用いて、MTSP9ー喪失機能を生成することができる。哺乳動物、*C. elegans*、ショウジョウバエおよび植物、ならびにヒトを含む生物におけるRNAiの沈黙遺伝子に対する使用に関しての方法は公知である(例えば、Fire et al. (1998) Nature 391: 806-811 Fire (1999) Trends Genet. 15: 358-363; Sharp (2001) Genes Dev. 15: 485-490; Hammond, et al. (2001) Nature Rev. Genet. 2: 110-1119; Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2: 239-245; Hamilton et al. (1999) Science 286: 950-952; Hammond et al. (2000) Nature 404: 293-296; Zamore et al. (2000) Cell 101: 25-33; Bernstein et al. (2001) Nature 409: 363-366; Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15: 188-200; Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-498; 国際PCT出願第WO 01/29058号; 国際PCT出願第WO 99/32619号、を参照)。

【0403】

二重鎖RNA(dsRNA)を発現する構築物は、エピソーム的のままであるかもしくはゲノムに統合されるところの複製可能なベクターを用いて、動物もしくは植物のような宿主に導入される。適切な配列を選択することによって、dsRNAの発現は、MTSP9をコード化する内在性mRNAの蓄積に干渉することができる。また、RNAiを用いて、インビトロで発現を阻害することができる。MTSP9を使用して、RNAiを調製するので、領域は、選択的(即ち、ユニーク)であるところの少なくとも約21個(もしくは21個)のヌクレオチドを含む。約21個のヌクレオチドのより小さなフラグメントは、直接的に(即ち、インビトロでもしくはインビボで)細胞へ形質転換され得る; より大きなRNAi dsRNA分子は、一般的にそれらをコード化するベクターを用いて、導入される。dsRNA分子は、少なくとも約21bp長、もしくは50、100、150、200およびそれより長い、のようにより長い、ものである。核酸分子をインビトロでおよびインビボで細胞に導入するための方法、試薬およびプロトコールは、当業者に公知である。

【0404】

3. 遺伝子治療

例示的な実施態様では、MTSP9ポリペプチドまたはその機能的ドメインもしくは誘導体をコード化する、ヌクレオチドの配列を含むところの核酸を、遺伝子治療という目的で投与して、MTSP9ポリペプチド機能を促進する。遺伝子治療とは、対象への核酸の投与により実施される治療をいう。この実施態様では、核酸は、MTSP9ポリペプチド機能を促進することによって治療効果を仲介するところのそのコード化されたタンパク質を生産する。当分野において利用可能な遺伝子治療のための任意の方法を使用することができる(Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12: 488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993); Mulligan, Science 260: 926-932 (1993); and Morgan and Anderson, An. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993); TIBTECH 11(5): 155-215 (1993)、を参照)。

【0405】

例えば、遺伝子治療のための一つの治療的組成物は、MTSP9ポリペプチドまたはそのドメイン、フラグメントもしくはキメラタンパク質誘導体を、適当な宿主中で発現する発

現ベクターの部分であるところの、MTSP9ポリペプチドをコード化する核酸を含む。特に、そのような核酸は、MTSP9ポリペプチドコード化領域に機能することができるように結合されたプロモーターを有して、プロモーターは誘導的もしくは構成的であって、かつ任意に、組織特異的である。もう一つの特定の実施態様では、その中でMTSP9ポリペプチドコード化配列および任意の他の所望の配列が、ゲノム中の所望の部位で相同的な組換えを促進するところの領域を側面に持ち、かくしてSPタンパク質核酸の染色体発現に備えているところの核酸分子が用いられる(Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342: 435-438 (1989))。

【0406】

患者への核酸の送達は、直接的に、その場合には患者は、核酸もしくは核酸-運搬ベクターに直接的に露出される、または、間接的に、その場合には細胞を最初インビトロで核酸にて形質転換し、次いで患者へ移植する、のどちらかであり得る。これらの二つのアプローチは、それぞれ、インビボもしくはエクスピボ遺伝子治療として、公知である。

【0407】

特定の実施態様では、それを発現してコード化された生成物を生産するところへ、核酸をインビボで直接的に投与する。これは、当分野で公知の多数の方法のうち任意のものにより、例えば、適切な核酸発現ベクターの部分としてそれを構築して、それが細胞内に入るように、例えば、欠損化もしくは弱毒化されたレトロウイルス性もしくは他のウイルス性ベクター(米国特許第4,980,286号を参照)を用いる感染により、または裸のDNAの直接的注射により、または微粒子爆撃(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくは形質転換剤によるコーティング、リポソーム、微粒子もしくはマイクロカプセル中への封入の使用により、それを投与することによって、または核に入ることが公知であるところのペプチドへ結合してそれを投与することによって、受容体-仲介性エンドサイトーシス(例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)、を参照)(受容体の特異的に発現する細胞タイプを標的とするために使用され得るところの)を受けるリガンドへ結合してそれを投与することによって等で、達成することができる。

【0408】

もう一つの実施態様では、リガンドはエンドソームを妨害するための紡錘菌産生のウイルス性ペプチドであって、核酸がリソソーム分解を回避することを可能にするところの核酸-リガンド複合体が形成される。なおもう一つの実施態様では、特異的な受容体をターゲットィングすることによって、核酸を、インビボで細胞特異的な取り込みおよび発現に目標に定めることができる(例えば、1992年4月16日の日付けのPCT公開WO 92/06180 (Wu et al.); 1992年12月23日の日付けのWO 92/22635 (Wilson et al.); 1992年11月26日の日付けのWO 92/20316 (Find eis et al.); 1993年7月22日の日付けのWO 93/14188 (Clarke et al.)), 1993年10月14日の日付けのWO 93/20221 (Young)、を参照)。これに代えて、核酸を細胞内的に導入し、そして発現のために宿主細胞DNA内に相同的組換え(Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342: 435-438 (1989))により組み込むことができる。

【0409】

特定の実施態様では、MTSP9ポリペプチド核酸を含むところのウイルス性ベクターが用いられる。例えば、レトロウイルス性ベクターを用いることができる(Miller et al., Meth. Enzymol. 217: 581-599 (1993)、を参照)。これらのレトロウイルス性ベクターは、ウイルス性ゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの統合のために必要でないところのレトロウイルス性配列を欠失するように修飾されている。遺伝子治療において用いられるべきMTSP9ポリペプチド核酸は、患者への遺伝子の送達を促進する、ベクター中にクローン化される。レトロウイルス性ベクターについてのさらに多くの詳細は、Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)に見出され、それは幹細胞を化学療法により抵

10

20

30

40

50

抗性にするために、*mdr1* 遺伝子を造血幹細胞に送達するようにレトロウイルスベクターの使用を記載している。遺伝子治療におけるレトロウイルス性ベクターの使用を例示している他の参照文献は：Clowes et al., J. Clin. Invest. 93: 644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83: 1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4: 129-141 (1993); and Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114 (1993)、である。

【0410】

アデノウイルスは、遺伝子治療で用いられ得る他のウイルス性ベクターである。アデノウイルスは、気道上皮へ遺伝子を送達するための特に魅力的なベクターである。アデノウイルスは、それらが軽い疾患を引き起こす気道上皮を自然に感染させる。アデノウイルスを基盤とする送達システムのための他の標的は、肝臓、中枢系、内皮細胞および筋肉である。アデノウイルスは、非分割細胞を感染する能力があるという利点を有する。Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 (1993)は、アデノウイルスを基盤とする遺伝子治療の総説を提示する。Bout et al., Human Gene Therapy 5: 3-10 (1994)は、アデノウイルスベクターの使用がアカゲザルの気道上皮に遺伝子を移送することを立証した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rose nfeld et al., Science 252: 431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68: 143-155 (1992); and Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91: 225-234 (1993)中に見られ得る。

また、アデノ随伴ウイルス(AAV)が、遺伝子治療での使用のために提唱されている(W alsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993).)。

【0411】

遺伝子治療への他のアプローチは、遺伝子を組織培養中の細胞に、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム仲介トランスフェクション、もしくはウイルス感染のような方法によって移送することを伴う。普通、移送の方法としては、選択可能なマーカーの細胞への移送が挙げられる。次いで、細胞を選択下に置いて、移送された遺伝子を取り込み、発現しているところのそれらの細胞を単離する。次いで、それらの細胞を患者に送達する。

【0412】

この実施態様では、核酸は、得られた組換え細胞のインビボ投与に先立って細胞へ導入される。そのような導入を、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルス性もしくはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体-仲介遺伝子移送、微小核体-仲介遺伝子移送、スフェロプラスト融合等、を含むが、それらに限定されない、当分野において公知の任意の方法によって、実施することができる。外来遺伝子を細胞に導入するための多数の技法が、当分野において公知であって(例えば、Loeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217: 599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217: 618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 6992 (1985)、を参照)、受け入れ細胞の必要な発育的および生理的機能が妨害されない条件で、用いられることができる。技法は、核酸が細胞によって発現可能であって、一般的に遺伝性であり、かつその細胞の子孫によって発現可能であるように、細胞への核酸の安定な移送に備えるべきである。

【0413】

得られた組換え細胞を、当分野において公知の種々の方法によって、患者に送達することができる。一つの実施態様では、内皮細胞を、例えば、皮下的に注射することができる。もう一つの実施態様では、組換え皮膚細胞を、患者への皮膚移植片として適用することができる。組換え血液細胞(例えば、造血幹もしくは前駆細胞)を、静脈内に投与することができる。使用を考慮する細胞の量は、所望の効果、患者の状態等に依存し、当業者によって決定されることができる。

【0414】

その中に核酸を遺伝子治療の目的で導入することができる細胞は、任意の所望の

10

20

30

40

50

、利用可能な細胞型を包含し、そして、上皮細胞、内皮細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血液細胞；種々の幹もしくは前駆細胞、特に、骨髄、臍帯血、末梢血、胎仔性肝臓、およびそれらの他の供給源から得られる幹細胞のような、造血幹もしくは前駆細胞、が挙げられるが、それらに限定されない。

【0415】

例えば、遺伝子治療に用いられる細胞は、患者の自己由来である。組換え細胞を遺伝子治療に用いるところの実施態様では、MTSP9ポリペプチド核酸を細胞内に、それが細胞もしくはその前駆体によって発現されるように、導入し、次いでその組換え細胞を、治療効果のためにインビボで投与する。特定の実施態様では、幹細胞もしくは前駆細胞を用いる。単離されて、そしてインビトロで保持されるところの任意の幹および／もしくは前駆細胞を、潜在的にはこの実施態様にしたがって用いることができる。そのような幹細胞としては、造血幹細胞(HSC)、皮膚および腸管の被膜のような上皮組織の幹細胞、胎仔性心筋細胞、肝臓幹細胞(1994年4月28日の日付けのPCT公開WO 94/08598)および神経幹細胞(Stemple and Anderson, Cell 71: 973-985 (1992))が、挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0416】

上皮幹細胞(ESC)もしくは表皮細胞を、皮膚および腸管の被膜のような組織から、公知の手順(Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980))によって得ることができる。皮膚のような層状化した上皮組織では、再生は、基板に最も接近した層である基底層の中の幹細胞の有糸分裂によって起こる。腸管の被膜内の幹細胞は、この組織の急速な再生速度に備えている。患者もしくはドナーの皮膚および腸管の被膜から得られるESCもしくは表皮細胞を、組織培養で生長させることができる(Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A: 229 (1980); Pittelkow and Scott, Cano Clinic Proc. 61: 771 (1986))。もしESCが、ドナーによって提供されるならば、宿主対移植片反応の抑制方法(例えば、穏かな免疫抑制を促進するための照射、剤もしくは抗体の投与)をまた、用いることができる。

20

【0417】

造血幹細胞(HSC)に関しては、HSCの単離、増殖およびインビトロでの保持に備えるところの任意の技法を、この実施態様において用いることができる。これを達成することができる技法としては、(a)将来の宿主、もしくはドナー、から単離される骨髄細胞からのHSC培養株の単離および確立、または(b)同種もしくは異種であり得るところの、以前に確立された、長期HSC培養株の使用、が挙げられる。一般的には、非自己HSCが、将来の宿主／患者の移植免疫反応を抑制する方法で用いられる。特定の実施態様では、ヒト骨髄細胞を針穿刺吸引(例えば、Kodo et al., J. Clin. Invest. 73: 13771384 (1984)、を参照)による後部腸骨稜から取得することができる。例えば、HSCを高度に富化されたかもしくは実質的に純粋な形態にすることができる。この富化を、長期培養の以前に、間に、もしくは以後に、達成して、当分野において公知の任意の技法で行うことができる。骨髄細胞の長期培養株を、例えば、修飾されたDexterの細胞培養技法(Dexter et al., J. Cell Physiol. 91: 335 (1977))もしくはWitlock-Witteの培養技法(Witlock and Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 36083612 (1982))を用いて確立し、保持することができる。

30

40

【0418】

特定の実施態様では、遺伝子治療の目的で導入される核酸としては、転写の適切な誘導物質の存在もしくは不在を制御することによって核酸の発現が制御可能となるように、コード化領域に機能し得るように結合された誘導性プロモーターが挙げられる。

【0419】

3. プロドラッグ

腫瘍を処置するための方法が提供される。この方法は、活性部位でMTSP9によって切断されて、活性薬物を放出するところのプロドラッグもしくはインビボ活性薬物に変換され得るところの前駆体を投与することによって、実行される。MTSP9活性を発現す

50

るところの細胞と接触すると、プロドラッグは活性剤に変換される。プロドラッグは、薬物もしくは剤が結合体中では不活性であるかもしくは細胞に入ることができないが、切断で活性化されるように、目標を定めたM T S Pのための基質に結合された、細胞毒性剤のような抗腫瘍薬もしくは他の治療剤(T A)のような、活性剤を含有するところの結合体であり得る。プロドラッグは、例えば、目標を定めたM T S Pによってタンパク質分解的に切断されるところのオリゴペプチド、典型的には、比較的短い、約10個以下のアミノ酸ペプチド、を含有することができる。細胞毒性剤としては、アルキル化剤、抗増殖剤およびチューブリン結合剤が挙げられるが、これらに限定されない。他のものとしては、ビンカ薬物、マイトマイシン、ブレオマイシンおよびタキサンが挙げられる。

【0420】

10

M. 動物モデル

マウスおよびラットを含むゲッシ類、ウシ、ニワトリ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ゴリラを含むサル、ならびに他の霊長類のような、トランスジェニック動物モデルおよび動物が、本明細書において提供される。特に、M T S P 9ポリペプチドをコード化する異種核酸を含むところのトランスジェニック非ヒト動物またはそのポリペプチドの発現が、内在性遺伝子のプロモーター領域もしくは他の制御領域を置換するかもしくは修飾することによるように、変更されているところのトランスジェニック動物が、提供される。内在性核酸および、相同的なもしくは他の組換え事象を介する、強力なプロモーターのもとでの発現によるように、過剰発現もしくは誤発現され得るであろうところの外来性M T S P 9遺伝子との間の組換えを促進することによって、そのような動物を生産することができる。

20

【0421】

トランスジェニック動物を、マイクロインジェクション、リポフェクションおよび生殖系細胞もしくは、胎仔性幹細胞のような体細胞への遺伝子送達の他の様式、を含むが、それらに限定されない、送達の任意の公知の方法を用いて核酸を導入することにより、生産することができる。典型的には、核酸を、胎児性幹細胞(E S)のような細胞中へ導入し、引き続いてE S細胞を胞胚へ注射し、胞胚を代理母へ移植するが、それはトランスジェニック動物の誕生に続く。一般的には、動物の染色体への異種核酸分子の導入は、異種のM T S P 9コード化核酸および内在性核酸との間の組換えによって起こる。異種核酸を、特定の染色体に目標を定めさせることができる。或る例においては、ノックアウト動物を生産することができる。そのような動物を、その染色体中のM T S P 9ポリペプチド遺伝子および生物学的に不活性に変えられている(典型的には異種配列、例えば、抗生物質抵抗性遺伝子、の挿入によって)ところの外来性M T S P 9ポリペプチド遺伝子との間の相同的組換えを促進することによって、初めに生産することができる。

30

【0422】

一つの実施態様では、相同的組換えが起こり、引き続いてE S細胞を胞胚へ注射して、胞胚を代理母の中に移植し、M T S P 9ポリペプチド遺伝子が不活性化されている(Capēcchi, Science 244: 12881292 (1989)を参照)ところのキメラ動物('ノックアウト動物')の誕生に引き続くように、挿入的に不活性化されたM T S P 9ポリペプチド遺伝子を含むベクターで、胎仔由来の幹(E S)細胞を形質転換することによって、この相同的組換えを実施する。キメラ動物を飼育して、同型接合ノックアウト動物を生産することができて、次いで、それを用いて、さらに別のノックアウト動物を生産することができる。ノックアウト動物としては、マウス、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウシ、および他の非ヒト哺乳動物が、挙げられるが、それらに限定されない。例えば、ノックアウトマウスが生産される。得られた動物は、M T S P 9ポリペプチドの過剰発現を示すところの、がんのような特異的な疾患のモデルとして役立ち得る。そのようなノックアウト動物を、そのような疾患の動物モデルとして用いて、例えば、そのような疾患もしくは障害を処置するかもしくは予防する能力に対して、分子をスクリーニングするかまたは試験することができる。

40

【0423】

また、M T S P 9ポリペプチドを過剰発現するところのものを含む、他の型のトランスジェニック動物を生産することができる。そのような動物としては、正常な遺伝子が、突然

50

変異体、過剰発現形態もしくは他の形態のような、変異体によって置換されている動物であるところの「ノックイン」動物が、挙げられる。例えば、げっし類のもののような一つの種の内在性遺伝子を、ヒトからのような、他の種からの遺伝子によって置換することができる。また、染色体中の他の部位への異種的組換えによって、動物を生産することができる；複数の組み込み事象を有するところの動物を含む。

【0424】

第一世代のトランスジェニック動物の生産の後で、キメラ動物を飼育して、過剰発現されたもしくは誤発現されたMTSP9ポリペプチドを持つさらに別の動物を生産することができる。そのような動物としては、マウス、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウシ、および他の非ヒト哺乳動物が、挙げられるが、これらに限定されない。得られた動物は、MTSP9ポリペプチドの過剰発現もしくは誤発現を示すところの、がんのような特異的な疾患のモデルとして、役立ち得る。そのような動物を、そのような疾患の動物モデルとして用いて、例えば、そのような疾患もしくは障害を処置するかもしくは予防する能力にたいして、分子を、スクリーニングするかまたは試験することができる。特定の実施態様では、過剰発現されたもしくは誤発現されたMTSP9ポリペプチドを持つマウスが生産される。

10

【0425】

以下の実施例は、単に例証的な目的のために含まれて、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

20

【0426】

MTSP9の同定

マトリプターゼ(MTSP1；受け入れ番号AF118224)のプロテアーゼドメインのタンパク質配列を用いて、ヒトHTGS(ハイスループットゲノム配列)データベースをtblastnアルゴリズムを使用して検索した。この検索およびアライメントアルゴリズムは、タンパク質問い合わせ配列を全ての6つのリーディングフレーム(両方の鎖)中で動的に翻訳されるヌクレオチド配列データベースに対して比較する。本明細書においてMTSP9と呼称するものを含む、いくつかの潜在的なセリンプロテアーゼが同定された。

【0427】

MTSP9の翻訳された配列は、マトリプターゼと36%の同一性を有する。MTSP9は、第15染色体上に局在しているように見える(ACO12571クローン)。GenBankに預託されている配列の検索は、同一の配列は預託されていないことを示した。ヒトESTデータベースのさらなる検索は、1個のESTクローン(HSU77054と呼称される；GenBank受入れ番号U77054)が、3個のヌクレオチドのミスマッチを除いて、MTSP9配列の短いセグメント(配列番号5のnt631～nt754、もしくは配列番号17の完全長クローンnt. 1162～1279中の相当する配列)にほぼ完全にマッチすることを示した。

30

【0428】

MTSP9のクローニングのための組織源の同定

ゲノム配列から由来したMTSP9のヌクレオチド配列を用いて、二つの遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーをデザインした。5'末端のプライマーの配列は、5'GGCAAGCTTCCCTTCAGTATGATTAACATCCATCAG3'(配列番号7)であり、3'末端のプライマーの配列は、5'AATGAGATACCAACGTATCTTTTCAGATCCCTTG3'(配列番号8)である。これらのプライマーを用いて、正常ヒト組織由来の8つのcDNAライブラリーのパネル(ヒト多重組織cDNAパネルI；Clontech, Palo Alto, CA；カタログ番号K14201)をスクリーニングした。ヒト臍臓中に一つのバンド(約700bp)が検出されて、そしてそれに続く配列分析は、このDNAフラグメントのヌクレオチド配列がゲノムのMTSP9のエキソン配列のそれにマッチすることを示した。

40

【0429】

50

正常な、腫瘍細胞および細胞株中におけるMTSP9の遺伝子発現プロフィール
 MTSP9転写物の遺伝子発現プロフィールを得るために、ヒト臍臓から得たMTSP9
 のcDNAフラグメントを用いて、76の異なるヒト組織(ヒト多重組織発現(MTE)ア
 レイ; Clontech, Palo Alto, CA; カタログ番号77751)から抽出したRNAより成る
 ドットプロットを調べた。この分析の結果は、MTSP9は、食道において高度に発現し
 、多くの他の組織において低レベルで発現していることを示した。MTSP9転写物は、
 腎臓(成人、胎児)、脾臓(成人、胎児)、胎盤、肝臓(成人、胎児)、胸腺、末梢血リンパ球
 、肺(成人、胎児)、臍臓、リンパ節、骨髄、気管、子宮、前立腺、食道、精巣、卵巣なら
 びに腺器官(乳腺、副腎、甲状腺、脳下垂体および唾液腺)に見出される。MTSP9はま
 た、食道腫瘍組織、肺癌(A549細胞株)、ならびに低レベルで結腸直腸癌(SW480) 10
 、リンパ腫(RajiおよびDaudi)、子宮頸癌(HeLaS3)および白血病(HL-
 60、K-562およびMOLT-4)細胞株で発現される。

【0430】

MTSP9の完全長プロテアーゼドメインをコード化するcDNAのPCR増幅
 MTSP9のプロテアーゼドメインをコード化するcDNAフラグメントを得るために、
 遺伝子特異的プライマーおよびヒト食道由来のcDNAを用いる終端間PCR増幅を使用
 した。使用した二つのプライマーは：5'末端用は、5'CGAGTTGTTC CAT
 TAAACGTC AACAGAA TAGC3' (配列番号9)、そして3'末端用は、5'
 GCATACAGCTTTCTTTGTTTAACTTTTATCGTG 3' (配列番
 号10)である。両プライマーのための配列は、MTSP9のゲノム配列から得られた。 20
 5'プライマーは、MTSP9プロテアーゼドメインの開始のすぐ上流の領域をコード化
 する配列(RVVPLNVNRIA; 配列番号12)を含んでいた。3'プライマーは、推
 定停止コドンの直後の配列に対応する。約750bpのフラグメントが、ヒト食道cDN
 Aライブラリーから増幅された。PCR産物を単離して、QIAquickゲル抽出キット(Qiag
 en, Valencia, CA; カタログ番号28704)を用いることにより精製した。MTSP9産
 物を用いて、PichiaベクターのpPIC9K中にサブクローン化するための適切な制限部
 位を含有するcDNAフラグメントを増幅した。使用した遺伝子特異的プライマーは
 5'末端で、5'TCTCTCTCGAGAAAGAAATAGCATCTGGAGTCA T
 TGCACCCCAAG3' (配列番号13)、および
 3'末端で、5'ATAGCGGCCCGCA TTAGATGCCCTGTTTTTGAAG 30
 CAAATC3' (配列番号14)である。5'末端のプライマーは、Pichiaプロテアーゼ切
 断部位のすぐ上流にXhoI部位(下線部)、およびMTSP9プロテアーゼドメインの一
 部(KRIASGVIA PK; 配列番号15)を含有している一方で、3'末端は、停止コ
 ドン(太字)のすぐ下流にNotI部位(下線部)を含有していた。

【0431】

RACEによるMTSP9の完全長cDNAのクローニング
 RACE対応のcDNAライブラリーを、ヒト正常および腫瘍食道のポリA+RNAから
 SMART-RACE cDNA増幅キット(Clontech; カタログ番号K18111)およ
 びFirst Choice RLMRACEキット(Ambion, Austin, TX; カタログ番号1700)
 を用いて調製した。5'-RACE反応には、アンチセンス遺伝子特異的プライマー(5' 40
 ' AATGAGATACCA CGTATCTTTTCAGATCCCTTG 3' 配列番号
 19)を、cDNAの5'末端に存在するアダプターにハイブリダイズするセンスプライ
 マーと一緒に使用した。一つのバンド(約1.3kbp)を増幅し、そしてMTSP9のプ
 ロテアーゼドメインからなるプローブに対してサザン分析により同定した。3'-RAC
 E反応は、使用したセンス遺伝子特異的プライマーが5'ATGAGAA GTACCGC
 TCTGCA GCAAGAGAG 3' (配列番号20)であったことを除いて、類似の様式
 で行った。一つのバンド(約0.8kbp)を増幅して、アガロースゲルから単離した。二
 つのRACE産物を、TAクローニング(TOPO TAクローニングキット; Invitrog
 en, Carlsbad, CA; カタログ番号K450001)を用いて、E. coliベクター中に別々に
 サブクローン化した。形質転換後、代表的なクローンからのプラスミドDNAを単離して 50

、精製し、そしてEcoRIで消化して、挿入体の存在をチェックした。プラスミドDNAを、最初はM13順方向および逆方向プライマーで、次いで全挿入体に亘る両方向の遺伝子特異的プライマーでシーケンシングした。

【0432】

MTSP9のセリンプロテアーゼドメインおよび他のプロテアーゼとの相同性
MTSP9の翻訳されたコード領域の配列分析は、N末端における膜貫通ドメインおよびC末端におけるトリプシン様セリンプロテアーゼドメインの存在を示した。これらのドメインの間には、既知の識別可能なドメインを持たないで、そしてエンドセリナーゼ1中の同じ一続きと20%の同一性を共有する、一続きのタンパク質配列(149個のアミノ酸残基長)がある。全体として、MTSP9の完全長タンパク質配列は、ヒトエンドセリナーゼ1(DESC1; Genbank受入れ番号AF064819)と42%の同一性を、そしてもう一つのII型膜型セリンプロテアーゼ、ヒト気道トリプシン様セリンプロテアーゼ(Genbank受入れ番号NP004253)と40%の同一性を共有する。MTSP9プロテアーゼドメイン配列の分析は、それが、ドメインの初めにプロテアーゼ活性化切断部位、および触媒ドメインの3つの高度に保存されている領域中に触媒3残基(ヒスチジン、アスパラギン酸およびセリン)の存在を特徴とするトリプシン様セリンプロテアーゼドメインであることを示した。プロテアーゼドメイン配列のアライメントは、エンドセリナーゼ1との56%同一性およびヒト気道トリプシン様プロテアーゼドメインとの48%同一性を示した。

10

【0433】

配列分析

MTSP9のcDNAおよびタンパク質配列を、MacVector (version 6.5; Oxford Molecular Ltd., Madison, WI)を用いて分析した。MTSP9のプロテアーゼドメインをコード化するcDNAは、232個のタンパク質に翻訳されるところの699bp長である。プロテアーゼドメインのヌクレオチド配列およびMTSP9の翻訳されたタンパク質配列は、次の通りである(配列番号5、6および16を参照)：

プロテアーゼドメイン配列範囲を含むMTSP9-cDNA：1ないし777(プロテアーゼコーディングドメイン31-729)

20

【化1】

```

10      20      30      40      50      60
AAACGAGTTGTTCCATTAAACGTCAACAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCACCCAAGGCG
TTTGCTCAACAAGGTAATTTGCAGTTGTCTTATCGTAGACCTCAGTAACGTGGGTTCGCG
70      80      90      100     110     120
GCCTGGCCTTGGCAAGCTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAGTGTGGGGCCACCTTG
CGGACCGGAACCGTTTGAAGGGAAGTCATACTATTGTAGGTAGTCACACCCCGGTGGAAC
130     140     150     160     170     180
ATTAGTAACACATGGCTTGTCACTGCAGCACACTGCTTCCAGAAGTATAAAAAATCCACAT
TAATCATTGTGTACCGAACAGTGACGTCGTGTGACGAAGGTCTTCATATTTTAGGTGTA
190     200     210     220     230     240
CAATGGACTGTTAGTTTTTGGAAACAAAAATCAACCCTCCCTTAATGAAAAGAAATGTCAGA
GTTACCTGACAATCAAAACCTTGTTTTTAGTTGGGAGGGAATTACTTTTCTTTACAGTCT
250     260     270     280     290     300
AGATTTATTATCCATGAGAAGTACCGCTCTGCAGCAAGAGAGTACGACATTGCTGTTGTG
TCTAAATAATAGGTACTCTTCATGGCGAGACGTCGTTCTCTCATGCTGTAACGACAACAC
310     320     330     340     350     360
CAGGTCTCTTCCAGAGTCACCTTTTCGGATGACATACGCCGATTTGTTTGCCAGAAGCC
GTCCAGAGAAGGTCTCAGTGGAAAAGCCTACTGTATGCGGCCTAAACAAACGGTCTTCGG
370     380     390     400     410     420
TCTGCATCCTTCCAACCAAATTTGACTGTCCACATCACAGGATTTGGAGCACTTTACTAT
AGACGTAGGAAGGTTGGTTTAAACTGACAGGTGTAGTGTCTTAAACCTCGTGAAATGATA
430     440     450     460     470     480
GGTGGGGAATCCCAAAATGATCTCCGAGAAGCCAGAGTGAAAATCATAAGTGACGATGTC
CCACCCCTTAGGGTTTTACTAGAGGCTCTTCGGTCTCACTTTTAGTATTCACTGCTACAG
490     500     510     520     530     540
TGCAAGCAACCACAGGTGTATGGCAATGATATAAAACCTGGAATGTTCTGTGCCGGATAT
ACGTTCTGTTGGTGTCCACATACCGTTACTATATTTTGGACCTTACAAGACACGGCCTATA
550     560     570     580     590     600
ATGGAAGGAATTTATGATGCCTGCAGGGGTGATTCTGGGGGACCTTTAGTCACAAGGGAT
TACCTTCCTTAAATACTACGGACGTCCCACTAAGACCCCTGGAAATCAGTGTTCCCTA
610     620     630     640     650     660
CTGAAAGATACGTGGTATCTCATTGGAATTGTAAGCTGGGGAGATAACTGTGGTCAAAAG

```

10

20

【化 2】

```

GACTTTCTATGCACCATAGAGTAACCTTAACATTCGACCCCTCTATTGACACCAGTTTTTC
670     680     690     700     710     720
GACAAGCCTGGAGTCTACACACAAGTGACTTATTACCGAACTGGATTGCTTCAAAAACA
CTGTTCCGGACCTCAGATGTGTGTTCACTGAATAATGGCTTTGACCTAACGAAGTTTTTGT
730     740     750     760     770
GGCATCTAATTCACGATAAAAGTTAAACAAAGAAAGCTGTATGCAGGTCATATATGC
CCGTAGATTAAGTGCTATTTTCAATTTGTTTCTTTTCGACATACGTCCAGTATATACG

```

【0 4 3 4】

30

プロテアーゼドメイン配列を含有するMTSP9-cDNA 範囲：1～777(プロテ
アーゼコード化ドメイン31～729)

【化 3】


```

10      20      30      40      50      60
AAACGAGTTGTTCCATTAAACGTCAACAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCACCCAAGGCG
TTTGCTCAACAAGGTAATTTGCAGTTGTCTTATCGTAGACCTCAGTAACGTGGGTTCCGC
K R V V P L N V N R I A S G V I A P K A

70      80      90      100     110     120
GCCTGGCCTTGGCAAGCTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAGTGTGGGGCCACCTTG
CGGACCGGAACCGTTCGAAGGGAAGTCATACTATTGTAGGTAGTCACACCCCGGTGGAAC
A W P W Q A S L Q Y D N I H Q C G A T L

130     140     150     160     170     180
ATTAGTAACACATGGCTTGTCACTGCAGCACACTGCTTCCAGAAGTATAAAAAATCCACAT
TAATCATTGTGTACCGAACAGTGACGTCGTGTGACGAAGGTCTTCATATTTTAGGTGTA
I S N T W L V T A A H C F Q K Y K N P H

190     200     210     220     230     240
CAATGGACTGTTAGTTTTTGGAAACAAAAATCAACCCTCCCTTAATGAAAAGAAATGTCAGA
GTTACCTGACAATCAAACCTTGTTTTTAGTTGGGAGGGAATTACTTTTCTTTACAGTCT
Q W T V S F G T K I N P P L M K R N V R

250     260     270     280     290     300
AGATTTATTATCCATGAGAAGTACCGCTCTGCAGCAAGAGAGTACGACATTGCTGTTGTG
TCTAAATAATAGGTACTCTTCATGGCGAGACGTCGTTCTCTCATGCTGTAACGACAACAC
R F I I H E K Y R S A A R E Y D I A V V

310     320     330     340     350     360
CAGGTCTCTTCCAGAGTCACCTTTTCGGATGACATACGCCGATTGTTTGGCCAGAAGCC
GTCCAGAGAAGGTCTCAGTGGAAAAGCCTACTGTATGCGGCCTAAACAAACGGTCTTCGG
Q V S S R V T F S D D I R R I C L P E A

370     380     390     400     410     420
TCTGCATCCTTCCAACCAAAATTTGACTGTCCACATCACAGGATTTGGAGCACTTTACTAT
AGACGTAGGAAGGTTGGTTTAAACTGACAGGTGTAGTGTCTTAAACCTCGTGAAATGATA
S A S F Q P N L T V H I T G F G A L Y Y

430     440     450     460     470     480
GGTGGGGAATCCCAAAATGATCTCCGAGAAGCCAGAGTGAAAATCATAAGTGACGATGTC
CCACCCCTTAGGGTTTTACTAGAGGCTCTTCGGTCTCACTTTTAGTATTCACTGCTACAG
G G E S Q N D L R E A R V K I I S D D V

490     500     510     520     530     540
TGCAAGCAACCACAGGTGTATGGCAATGATATAAAACCTGGAATGTTCTGTGCCGGATAT
ACGTTTCGTTGGTGTCCACATACCGTTACTATATTTGGACCTTACAAGACACGGCCTATA
C K Q P Q V Y G N D I K P G M F C A G Y

550     560     570     580     590     600
ATGGAAGGAATTTATGATGCGCTGCAGGGGTGATTCTGGGGGACCTTTAGTCACAAGGGAT
TACCTTCCTTAAATACTACGGACGTCCCACTAAGACCCCTTGAAATCAGTGTTCCTTA
M E G I Y D A C R G D S G G P L V T R D

610     620     630     640     650     660

```

10

20

30

40

50

【化4】

```

CTGAAAGATACGTGGTATCTCATTGGAATTGTAAGCTGGGGAGATAACTGTGGTCAAAAG
GACTTTCTATGCACCATAGAGTAACCTTAACATTCGACCCCTCTATTGACACCAGTTTTT
L K D T W Y L I G I V S W G D N C G Q K

670     680     690     700     710     720
GACAAGCCTGGAGTCTACACACAAGTGACTTAFTACCGAAACTGGATTGCTTCAAAAACA
CTGTTTCGGACCTCAGATGTGTGTTCACTGAATAATGGCTTTGACCTAACGAAGTTTTGT
D K P G V Y T Q V T Y Y R N W I A S K T

GGCATCTAA
CCGTAGATT
G I *

```

【0435】

MTSP9のcDNAおよびタンパク質の配列を、MacVector(version 6.5; Oxford Molecular Ltd., Madison, WI)を用いて分析した。クローンをコード化する完全長は、1,422bp長であって、1,247bp長のコード領域を有する。翻訳されたタンパク質配

列は、418アミノ酸残基長である。MTSP9のプロテアーゼドメインをコード化するDNAは、232個のアミノ酸のタンパク質に翻訳されるところの699bp長である。

【0436】

MTSP9の完全長cDNA配列

配列範囲：1～1422

【化5】

```

      10      20      30      40      50      60
GGCGAGCTGGAAGGACGAATCTCCGGCAGCATTTCATTACGACAAATGAATGCTGCCGGAT
CCGCTCGACCTTCCTGCTTAGAGGCCGTCGTAAGTAATGCTGTTTACTTACGACGGCCTA

      70      80      90     100     110     120
TAGAAAGTTGAGTTCAGTGGGTGCAGACCTGCAAGATCATATTCTTCCTCCTGTACATGA
ATCTTTCAACTCAAGTCACCCACGTCTGGACGTTCTAGTATAAGAAGGAGGACATGTACT

      130     140     150     160     170     180
TGTATCGGACAGTAGGATTTGGCACCCGAAGCAGAAATCTGAAGCCATGGATGATTGCCG
ACATAGCCTGTCTCCTAAACCGTGGGCTTCGTCTTTAGACTTCGGTACCTACTAACGGC

      190     200     210     220     230     240
TTCTCATTGTGTTGTCCCTGACAGTGGTGGCAGTGACCATAGGTCTCCTGGTTCACCTCC
AAGAGTAACACAACAGGGACTGTCACCACCGTCACTGGTATCCAGAGGACCAAGTGAAGG

      250     260     270     280     290     300
TAGTATTTGACCAAAAAAGGAGTACTATCATGGCTCCTTTAAAATTTTAGATCCACAAA
ATCATAAACTGGTTTTTTTCTCATGATAGTACCGAGGAAATTTTAAAATCTAGGTGTTT

      310     320     330     340     350     360
TCAATAACAATTTTCGGACAAAGCAACACATATCAACTTAAGGACTTACGAGAGACGACCG
AGTTATTGTTAAAGCCTGTTTCGTTGTGTATAGTTGAATTCCTGAATGCTCTCTGCTGGC

      370     380     390     400     410     420
AAAATTTGGTGGATGAGATATTTATAGATTTCAGCCTGGAAGAAAAATTATATCAAGAACC
TTTTAAACCACCTACTCTATAAATATCTAAGTCGGACCTTCTTTTAAATATAGTTCTTGG

      430     440     450     460     470     480
AAGTAGTCAGACTGACTCCAGAGGAAGATGGTGTGAAAGTAGATGTCATTATGGTGTTC
TTCATCAGTCTGACTGAGGTCTCCTTCTACCACACTTTCATCTACAGTAATACCACAAGG

      490     500     510     520     530     540
AGTTCCCCTCTACTGAACAAAGGGCAGTAAGAGAGAAGAAAATCCAAAGCATCTTAAATC

```

10

20

30

【化6】

TCAAGGGGAGATGACTTGTTCCTCCCGTCATTCTCTCTCTTTTAGGTTTCGTAGAATTTAG

550 560 570 580 590 600
AGAAGATAAGGAATTTAAGAGCCTTGCCAATAAATGCCTCATCAGTTCAAGTTAATGCAA
TCTTCTATTTCCTTAAATTCTCGGAACGGTTATTTACGGAGTAGTCAAGTTCAATTACGTT

610 620 630 640 650 660
TGAGCTCATCAACAGGGGAGTTAACTGTCCAAGCAAGTTGTGGTAAACGAGTTGTTCCAT
ACTCGAGTAGTTGTCCCCTCAATTGACAGGTTCTGTTCAACACCATTTGCTCAACAAGGTA

670 680 690 700 710 720
TAAACGTCAACAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCACCCCAAGCGGCCTGGCCTTGGCAAG
ATTTGCAGTTGTCTTATCGTAGACCTCAGTAACGTGGGTTCGCCGACCGGAACCGTTC

730 740 750 760 770 780
CTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAGTGTGGGGCCACCTTGATTAGTAACACATGGC
GAAGGGAAGTCATACTATTGTAGGTAGTCACACCCCGGTGGAATAATCATTGTGTACCG

790 800 810 820 830 840
TTGTCACTGCAGCACACTGCTTCCAGAAGTATAAAAATCCACATCAATGGACTGTTAGTT
AACAGTGACGTCGTGTGACGAAGGTCTTCATATTTTTAGGTGTAGTTACCTGACAATCAA

850 860 870 880 890 900
TTGGAACAAAAATCAACCCTCCCTTAATGAAAAGAAATGTCAGAAGATTTATTATCCATG
AACCTTGTTTTTTAGTTGGGAGGGAATTACTTTTCTTTACAGTCTTCTAAATAATAGGTAC

910 920 930 940 950 960
AGAAGTACCGCTCTGCAGCAAGAGAGTACGACATTGCTGTTGTGCAGGTCTCTTCCAGAG
TCTTCATGGCGAGACCTCGTTCTCTCATGCTGTAACGACAACACGTCCAGAGAAGGTCTC

970 980 990 1000 1010 1020
TCACCTTTTCGGATGACATACGCCGGATTTGTTTGCCAGAAGCCTCTGCATCCTTCCAAC
AGTGGAAGGCCTACTGTATGCGGCCTAAACAAACGGTCTTCGGAGACGTAGGAAGGTTG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
CAAATTTGACTGTCCACATCACAGGATTTGGAGCACTTTACTATGGTGGGGAATCCCAAA
GTTTAACTGACAGGTGTAGTGTCTTAAACCTCGTGAAATGATACCACCCCTTAGGGTTT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ATGATCTCCGAGAAGCCAGAGTGAAAATCATAAGTGACGATGTCTGCAAGCAACCACAGG
TACTAGAGGCTCTTCGGTCTCACTTTTAGTATTCACTGTCTACAGACGTTCTGTTGGTGTCC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TGTATGGCAATGATATAAAACCTGGAATGTTCTGTGCCGATATATGGAAGGAATTTATG
ACATAACGTTACTATATTTTGGACCTTACAAGACACGGCCTATATACCTTCCTTAAATAC

1210 1220 1230 1240 1250 1260
ATGCCTGCAGGGGTGATTCTGGGGGACCTTTAGTCACAAGGGATCTGAAAGATACGTGGT
TACGGACGTCCCACTAAGACCCCTGGAATCAGTGTTCCCTAGACTTTCTATGCACCA

1270 1280 1290 1300 1310 1320
ATCTCATTGGAATTGTAAGCTGGGGAGATAACTGTGGTCAAAAGGACAAGCCTGGAGTCT
TAGAGTAACCTTAACATTGACCCCTCTATTGACACCAGTTTTCTGTTCCGACCTCAGA

1330 1340 1350 1360 1370 1380
ACACACAAGTGACTTATTACCGAAACTGGATTGCTTCAAAAACAGGCATCTAATTCACAA
TGTGTGTTCACTGAATAATGGCTTTGACCTAACGAAGTTTTTGTCCGTAGATTAAAGTGT

1390 1400 1410 1420
TAAAAGTTAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ATTTTCAATTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

10

20

30

40

M T S P 9 の完全長コード配列

配列範囲：1～1257

【化7】

10 20 30 40 50 60
ATGATGTATCGGACAGTAGGATTTGGCACCCGAAGCAGAAATCTGAAGCCATGGATGATT
TACTACATAGCCTGTCATCCTAAACCGTGGGCTTCGTCTTTAGACTTCGGTACCTACTAA

70 80 90 100 110 120
GCCGTTCTCATTGTGTTGTCCCTGACAGTGGTGGCAGTGACCATAGGTCTCCTGGTTCAC
CGGCAAGAGTAACACAACAGGGACTGTCACCACCGTCACTGGTATCCAGAGGACCAAGTG

130 140 150 160 170 180
TTCCTAGTATTTGACCAAAAAAGGAGTACTATCATGGCTCCTTTAAAAATTTTAGATCCA
AAGGATCATAAACTGGTTTTTTTCCCTCATGATAGTACCGAGGAAATTTTAAATCTAGGT

190 200 210 220 230 240
CAAATCAATAACAATTTTCGGACAAAGCAACACATATCAACTTAAGGACTTACGAGAGACG
GTTTAGTTATTGTTAAAGCCTGTTTCGTTGTGTATAGTTGAATTCCTGAATGCTCTCTGC

250 260 270 280 290 300
ACCGAAAATTTGGTGGATGAGATATTTATAGATTTCAGCCTGGAAGAAAAATTATATCAAG
TGGCTTTTAAACCACCTACTCTATAAATATCTAAGTCGGACCTTCTTTTAAATATAGTTC

310 320 330 340 350 360
AACCAAGTAGTCAGACTGACTCCAGAGGAAGATGGTGTGAAAGTAGATGTCATTATGGTG
TTGGTTCATCAGTCTGACTGAGGTCTCCTTCTACCACACTTTCATCTACAGTAATACCAC

370 380 390 400 410 420
TTCCAGTTCCTCTACTGAACAAAGGGCAGTAAGAGAGAAGAAATCCAAAGCATCTTA
AAGGTCAAGGGGAGATGACTTGTTTCCCGTCATTCTCTCTTCTTTAGGTTTCGTAGAAT

430 440 450 460 470 480
AATCAGAAGATAAGGAATTTAAGAGCCTTGCCAATAAATGCCCTCATCAGTTCAAGTTAAT
TTAGTCTTCTATTCCTTAAATTCTCGGAACGGTTATTTACGGAGTAGTCAAGTTCAATTA

490 500 510 520 530 540
GCAATGAGCTCATCAACAGGGGAGTTAACTGTCCAAGCAAGTTGTGGTAAACGAGTTGTT
CGTTACTCGAGTAGTTGTCCCCTCAATTGACAGGTTTCGTTCAACACCATTGCTCAACAA

550 560 570 580 590 600
CCATTAAACGTCAACAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCACCCAAGGCGGCCTGGCCTTGG
GGTAATTTGCAGTTGCTTTATCGTAGACCTCAGTAACGTGGGTTCGCCGGACCGGAACC

610 620 630 640 650 660
CAAGCTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAGTGTGGGGCCACCTTGATTAGTAACACA
GTTTCAAGGGGAGTCATACTATTGTAGGTAGTCACACCCCGGTGGAACATAATCATTGTGT

670 680 690 700 710 720
TGGCTTGTCACTGCAGCACACTGCTTCCAGAAAGTATAAAAATCCACATCAATGGACTGTT
ACCGAACAGTGACGTCGTGTGACGAAGGTCTTCATATTTTTAGGTGTAGTTACCTGACAA

730 740 750 760 770 780
AGTTTTGGAACAAAAATCAACCCTCCCTTAATGAAAAGAAATGTCAGAAGATTATTATC
TCAAAACCTTGTTTTTAGTTGGGAGGGAATTAATTTTCTTTACAGTCTTCTAAATAATAG

790 800 810 820 830 840
CATGAGAAGTACCGCTCTGCAGCAAGAGAGTACGACATTGCTGTTGTGTCAGGTCTCTTCC
GTACTCTTCATGGCGAGACGTCGTTCTCTCATGCTGTAACGACAACACGTCCAGAGAAGG

850 860 870 880 890 900
AGAGTCACCTTTTCGGATGACATACGCCGGATTTGTTTGCCAGAAGCCTCTGCATCCTTC
TCTCAGTGGAAAAGCCTACTGTATGCGGCCTAAACAAACGGTCTTCGGAGACGTAGGAAG

10

20

30

40

```

910      920      930      940      950      960
CAACCAAATTTGACTGTCCACATCACAGGATTTGGAGCACTTTACTATGGTGGGGAATCC
GTTGGTTTAAACTGACAGGTGTAGTGTCTTAAACCTCGTGAAATGATACCACCCCTTAGG

970      980      990      1000     1010     1020
CAAAATGATCTCCGAGAAGCCAGAGTGAAAATCATAAGTGACGATGTCTGCAAGCAACCA
GTTTTACTAGAGGCTCTTCGGTCTCACTTTTAGTATTCACTGCTACAGACGTTTCGTTGGT

1030     1040     1050     1060     1070     1080
CAGGTGTATGGCAATGATATAAAACCTGGAATGTTCTGTGCGGATATATGGAAGGAATT
GTCCACATACCGTTACTATATTTTGGACCTTACAAGACACGCGCTATATACCTTCCTTAA

1090     1100     1110     1120     1130     1140
TATGATGCCTGCAGGGGTGATTCTGGGGGACCTTTAGTCACAAGGCATCTGAAAGATACG
AATCTACGACGTCCCACTAAGACCCCTGGAAATCAGTGTTCCTAGACTTTCTATGC

1150     1160     1170     1180     1190     1200
TGGTATCTCATTGGAATTGTAAGCTGGGGAGATAACTGTGGTCAAAGGACAAGCCTGGA
ACCATAGAGTAACCTTAACATTGACCCCTCTATTGACACCAGTTTCCTGTTTCGGACCT

1210     1220     1230     1240     1250
GTCTACACACAAGTGACTTATTACCGAAACTGGATTGCTTCAAAAACAGGCATCTAA
CAGATGTGTGTTCACTGAATAATGGCTTTGACCTAACGAAGTTTTGTCCGTAGATT

```

10

M T S P 9 の完全長タンパク質配列

配列範囲：1～419

【化9】

20

```

10      20      30      40      50      60
MMYRTVGFGRSRNLKPWMIAVLIVLSLTVVAVTIGLLVHFLVFDQKKEYYHGSFKILDP
____1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED)____>

70      80      90      100     110     120
QINNFGQSNFYQLKDLRETTENLVDEIFIDSAWKKNYIKNQVRLTPEEDGVKVDVIMV
____1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED)____>

130     140     150     160     170     180
FQFPSTEQRAVREKKIQSILNQKIRNLRALPINASSVQVNAMSSSTGELTVQASCGKRVV
____1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED)____>

190     200     210     220     230     240
PLNVNRIASGVIAPKAAWPQASLQYDNIHQCGATLISNTWLVTAAHCFQKYKNPHQWTV
____1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED)____>

250     260     270     280     290     300
SFGTKINPPLMKRNVRRFIIHEKYRSAAREYDIAVVQVSSRVTFSDDIRRICLPEASASF
____1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED)____>

310     320     330     340     350     360
QPNLTVHITGFGALYYGGESQNDLREARVKIISDDVCKQPQVYGNIDKPGMFCAGYMEGI
____1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED)____>

370     380     390     400     410
YDACRGDSGGPLVTRDLKDTWYLGIVSWGDNCGQKDKPGVYTQVTTYRNWIASKTGI*
____1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED)____>

```

30

40

【実施例2】

【0437】

プロテアーゼM T S Pドメインの発現

M T S P 9 およびそのプロテアーゼドメインのそれぞれをコード化する核酸を、*Pichia pastoris* のベクター p P I C 9 K (Invitrogenより入手可能；配列番号11を参照)の誘導体中にクローン化した。プラスミド p P I C 9 K の特徴は、1～948における5' A O X 1 プロモーターフラグメント；855～875における5' A O X 1 プライマー部位；949～1218におけるアルファ因子分泌シグナル(複数を含む)；1152～1172におけるアルファ因子プライマー部位；1192～1241における多重クローニング部位；1327～1347における3' A O X 1 プライマー部位；1253～1586にお

50

ける3' AOX1転写終結領域；4514～1980におけるHIS4 ORF；5743～4928におけるカナマイシン抵抗性遺伝子；6122～6879における3' AOX1フラグメント；7961～7288におけるColE1起点；および8966～8106におけるアンピシリン抵抗性遺伝子、を含む。プラスミドは、pPIC9Kからカナマイシン抵抗性遺伝子中のXhoI部位を除去することにより誘導されて、ここで得られたベクターは、本明細書においてpPIC9Kxと呼称される。

【0438】

MTSP9のプロテアーゼドメインのC122S突然変異誘発

MTSP9のプロテアーゼドメインをコード化する遺伝子をPCR SOE(オーバーラップ伸長によるPCRに基づくスプライシング)により突然変異を起こさせることによって、122位(キモトリプシンの番号付けシステム；MTSP9ではCys₂₉₂)の対をなしていないシステインをセリンで置換した。それぞれ122位にセリンに対するAGTコドンを含む、二つのオーバーラッピング遺伝子フラグメントを、次ぎのプライマーを用いてPCR増幅した：5' 遺伝子フラグメントには、TCTCTCGAGAAAGAAATAGCATCTGGAGTCAATTGCACCC(配列番号13)およびAGAGGCCTCTGGCAAACTAATCCGGCGTATGTC(配列番号14)；3' 遺伝子フラグメントには、ATTCTGGCGCGCTTAGATGCCCTGTTTTTGAAGCAAT(配列番号21)およびGACATACGCCCGGATTAGTTTGCCAGAGAGCCTCT(配列番号22)である。増幅された遺伝子フラグメントを1%アガロースゲル上で精製し、混合し、PCRで再増幅して、MTSP9 C122Sのプロテアーゼドメインに対する完全長コード化配列を生産した。次いで、この配列を、制限酵素NotIおよびXhoIで切断し、そしてベクターpPic9KX中に連結した。

【0439】

MTSP9発酵および初期産物回収

発酵

MTSP9のC122S突然変異体を発現するP. pastorisクローンGS115/pPIC9K：MTSP9 C122S Sac MC2を、5リットルのスケールで発酵した。200mlの1夜培養液(およそ25のOD600)を用いて、4つのBioflo容器(New Brunswick Scientific, Edison, NJ)のそれぞれの中で3.2リットルの発酵用培地に接種した。バッチ相の複合培地は、酵母抽出物10g/l、ペプトン20g/l、グリセリン40g/l、硫酸アンモニウム5g/l、硫酸カルシウム(2水和物)0.2g/l、硫酸マグネシウム(6水和物)2g/l、硫酸カリウム2g/l、ヘキサメタリン酸ナトリウム25g/l、および4.35ml/lのPTM1(CuSO₄・5H₂O 6.0g/l、NaI 0.08g/l、MnSO₄・H₂O 3.0g/l、Na₂MoO₄・2H₂O 0.2g/l、H₃BO₃ 0.02g/l、CoCl₂ 0.5g/l、ZnCl₂ 20.0g/l、FeSO₄・7H₂O 65.0g/l、ビオチン0.2g/l、H₂SO₄ 5.0ml/l)を含んでいた。培養物を、pH5.0および温度28℃でバッチ相で成長させた。濃水酸化アンモニウムを用いて、培養液のpHを維持した。KFO 880(KABO Chemicals, Cheyenne, WY)を使用して、必要に応じて、泡立ちを制御した(例えば、Zhang et al. (2000)「Pichia pastoris成長のメタノールへの適応および組換えタンパク質生産の最適化、血清型Aのボツリヌス神経毒の重鎖フラグメントC」、Biotechnology and Bioengineering Vol. 70, No 1、を参照)。

【0440】

バッチ相の発酵は約22時間続き、このときには培養物は、培地中の初めのグリセリンの全てを消費してしまっていた。この時点で、50%(w/v)グリセリンの基質制限供給バッチを18ml/l×時間で開始した。グリセリン供給バッチに入ってから2時間で、培養液のpHを、濃水酸化アンモニウムの添加により2時間に亘って5.0から7.0に直線的に増加させた。グリセリン供給バッチの持続時間は約4.5時間であった。培養物はこの時点までに220～250g/l細胞未乾重量の密度に到達した。

【0441】

グリセリン供給バッチの終了に続いてメタノール誘導を開始した。Zhang et al.の方法に従い、培養液1リットル当たり1.5 mlのメタノールを添加して、グリセリン供給速度を18 ml/l*時間から0 ml/l*時間に3時間に亘って減少させることにより、培養液をメタノール利用に移行させた。メタノール添加は、誘導を通して発酵槽を制御するために使用したMeOHセンサー(Raven Biotech, Vancouver, BC, Canada)のオンライン較正として役立った。初期量のメタノールが消費されたことがMeOHセンサーで示された後に、さらに別の15 ml/lを培養液に添加し、そしてMeOHセンサーを用いて、発酵槽中のメタノール濃度を誘導相を通してそのレベルに制御した。発酵槽に供給したメタノールには、2 ml/lのPTM4溶液($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 g/l、 NaIO_3 8 g/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 g/l、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l、 H_3BO_3 0.02 g/l、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l、 ZnCl_2 7.0 g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.0 g/l、ビオチン0.2 g/l、 H_2SO_4 1.0 ml/l)を補充した。誘導相は約42.5時間持続した。

【0442】

初期産物回収

それぞれの発酵からの上清み液を遠心により収穫し、プールし、次いで、SRT5限外濾過システム(North Carolina SRT, Cary, NC)上で10 kDaの限外濾過カートリッジ(A/G Technologies Corp., Needham, MA)を用いて約0.5リットルに濃縮した。濃縮物をシステムから排出させ、次いでシステムを濃縮物と等容量の50 mM Hepes、pH 7.0でゆすいだ。濃縮物とゆすぎ液とを合して約1リットルの最終限外濾過産物を得た。上清み液の最終澄清化を、SartoBran 300 0.45 + 0.2 μm カプセルフィルター(Sartorius Separations Div., Edgewood, NJ)を用いて行った。

【0443】

タンパク質精製-MTSP9

グリコシル化されたMTSP9の濃縮発酵上清み液を、50 mM Hepes、pH 7.0に対して透析し、ろ過し、そして50 mM Hepes、pH 7で予め平衡化させた147 mLのセファロース陽イオン交換樹脂カラム(Amersham-Pharmacia Biotech)に直接に充填した。7カラム用量に亘り、0~500 mL NaClの直線勾配を用いて、5 mL/分の流速でタンパク質を溶出した。

【0444】

活性フラクションをプールし、次いで50 mM Na_2HPO_4 、pH 5.5に対し一夜透析した。次いで、精製されたグリコシル化MTSP9を、タンパク質1 mg当たり0.1 mlのエンドグリコシダーゼH(ProZyme、5 U/ml)を添加して、一夜4°Cで穏やかに回旋させながらインキュベートすることにより脱グリコシル化した。次いで、透析したタンパク質溶液を、pH 7に調整し、ろ過し、147 mLのSPセファロース陽イオン交換カラム上に直接に充填して、上述のように溶出した。活性フラクションをプールし、ベンズアミジンを加えて、最終濃度を10 mMとした。タンパク質の純度をSDS-PAGEで調べ、タンパク質濃度をOD₂₈₀の測定および2.017 ml/(mg × OD₂₈₀)の理論吸光係数の使用により測定した。

【実施例3】

【0445】

MTSPの活性を調整する候補化合物の同定のためのアッセイ

阻害剤同定のためのアッセイ

試験化合物がMTSP9の触媒活性の阻害剤として作用する能力を、アミド分解活性で評価することができる。組換えMTSPもしくはそのプロテアーゼドメインによるアミド分解活性の阻害剤誘発性阻害を、そのようなアッセイにおいてIC₅₀値により測定することができる。

【0446】

上述のように発現されたMTSP9のプロテアーゼドメインを、種々の試験化合物による阻害についてCostar 96穴組織培養プレート(Corning NY)中で、以下のようにアッセイす

る。阻害剤無しで、もしくは10000 nMの阻害剤および7段階の1:6希釈と共に1X直接緩衝液(29.2 mM Tris、pH 8.4、29.2 mMのイミダゾール、217 mM NaCl(最終容積100 μL))の中に、およそ1~10 nMのプロテアーゼを添加して、室温で30分間インキュベートさせた。400 μMの基質S 2366 (L-ピログルタミン-L-プロリル-L-アルギニン-p-ニトロアニリン塩酸塩; DiaPharma, Westchester, OH)を添加して、そして反応をSpectraMAX Plusマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale CA)中で、37℃で20分間、405 nmの吸光度の変化を追うことによりモニターする。

【0447】

基質の同定

アッセイに使用する特定の基質を、基質を試験することにより経験的に同定することができる。次の基質のリストは、試験されることのできるものの例示的である。

【表2】

基質名	構造
S 2366	ピロ Glu-Pro-Arg-pNA.HCl
スペクトロザイム t-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA.AcOH
N-p-トリル-Gly-Pro-Arg-pNA	N-p-トリル-Gly-Pro-Arg-pNA
ベンゾイル-Val-Gly-Arg-pNA	ベンゾイル-Val-Gly-Arg-pNA
ペファクロムt-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA
S 2765	N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl
S 2444	pyroGlu-Gly-Arg-pNA.HCl
S 2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl
スペクトロザイム UK	Cbo-L-(γ)Glu(α-t-BuO)-Gly-Arg-pNA.2AcOH
S 2302	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl

【表3】

S 2266	H-D-Val-Leu-Arg-pNA.2HCl
S 2222	Bz-Ile-Glu(g-OR)-Gly-Arg-pNA.HCl R = H(50%) 及び R = CH ₃ (50%)
クロモザイム PK	ベンゾイル-Pro-Phe-Arg-pNA
S 2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl
S 2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA.2HCl
スペクトロザイム PI	H-D-Nle-HHT-Lys-pNA.2AcOH
	Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC
	H-Arg-Gln-Arg-Arg-AMC
	Boc-Gln-Gly-Arg-AMC
	Z-Arg-Arg-AMC
スペクトロザイム THE	H-D-HHT-Ala-Arg-pNA.2AcOH
スペクトロザイム fXIIa	H-D-CHT-Gly-Arg-pNA.2AcOH
	CVS 2081-6 (MeSO ₂ -dPhe-Pro-Arg-pNA)
	ペファクロム fVIIa (CH ₃ SO ₂ -D-CHA-But-Arg-pNA)

pNA = パラニトロアニリド (色素生産性)

AMC = アミノメチルクマリン (蛍光性)

【0448】

もし上記の基質のどれも切断されなければ、上述の結合アッセイを使用することができる。略述すれば、プロテアーゼが、プラスミノーゲンおよびトリプシノーゲンのような、酵素を活性化する能力を試験する。これらのアッセイを行うために、単鎖プロテアーゼを、

10

20

30

40

50

リスープラスミノーゲンのような、チモーゲンに対する既知の基質の存在下にプラスミノーゲンもしくはトリプシノーゲンのような、チモーゲンと共にインキュベートする。もし単鎖がチモーゲンを活性化すれば、プラスミンおよびトリプシンのような、活性化された酵素が、それに対する基質を分解するであろう。

【0449】

モジュレーターをスクリーニングするためのMTSP-9アッセイ

Pichia pastoris中で発現されるMTSP9のプロテアーゼドメインを、種々の試験化合物による阻害についてCostar 96穴組織培養プレート(Corning NY)中でアッセイした。阻害剤無しで、もしくは10000 nMの阻害剤および7段階の1:6希釈と共に1X直接緩衝液(29.2 mM Tris、pH 8.4、29.2 mMのイミダゾール、217 mM NaCl(最終容量100 μ L))に、およそ1~20 nMのMTSP9を添加して、室温で30分間インキュベートさせた。400 μ Mの基質petachrome FVIIa (Pentapharm, Norwalk, CT)を添加し、そして反応をSpectraMAX Plusマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale CA)中で、37°Cで20分間、405 nmの吸光度の変化を追うことによりモニターした。

【実施例4】

【0450】

他のアッセイ

これらのアッセイはMTSP1に関して記載されるが、そのようなアッセイはMTSP9での使用に容易に適合させることができる。

【0451】

マトリプターゼ即ちMTSP1のセリンプロテアーゼ活性の阻害を測定するためのアミド分解アッセイ

試験化合物がrMAPの触媒活性の阻害剤として作用する能力を、 IC_{50} 値で測定されるように、MAPによるアミド分解活性の阻害剤で誘発された阻害の測定により評価した。アッセイ用緩衝液は、HB SA(10 mM HEPES、150 mM塩化ナトリウム、pH 7.4、0.1%ウシ血清アルブミン)であった。別に記載が無い限り、全ての試薬はSigma Chemical Co. (St. Louis, MO)からであった。

【0452】

二つの IC_{50} アッセイを、(a)一つは30分もしくは60分時のどちらかで(試験化合物および酵素の30分もしくは60分のプレインキュベーション)、および(b)一つは0分時(試験化合物および酵素のプレインキュベーション無し)で、実施した。30分もしくは60分時の IC_{50} アッセイでは、以下の試薬をCorningマイクロタイタープレートの適切なウェル中で結合させて：50マイクロリットルのHB SA、HB SA中で希釈した(広い濃度範囲をカバー)50マイクロリットルの試験化合物(もしくは阻害されない速度の測定のためのHB SA単独)、および緩衝液中に希釈した、rMAP(Corvas International)50マイクロリットル、活性部位ろ過で測定した250 pMの終酵素濃度を得た。環境温度で30分もしくは60分のインキュベーションの後、それぞれのウェルへの50マイクロリットルの基質S-2765((N- α -ベンジルオキシカルボニル-D-アルギニル-L-グリシル-L-アルギニン-p-ニトロアニリンニ塩酸塩; DiaPharma Group, Inc.; Franklin, OH)の添加により、アッセイを開始して、200マイクロリットルの最終アッセイ容積および100 μ M(K_m の約4倍)の最終基質濃度を得た。アッセイ混合物への添加の前に、S-2765を脱イオン水中で水溶液に戻し、そしてHB SA中で希釈した。0分時での IC_{50} アッセイのためには；同じ試薬を結合させた：50マイクロリットルのHB SA、HB SA中で希釈した(広い濃度範囲をカバー)50マイクロリットルの試験化合物(もしくは阻害されない速度の測定のためのHB SA単独)、および50マイクロリットルの基質S-2765である。アッセイを、50マイクロリットルのrMAPの添加により開始した。全ての成分の最終濃度は、両方の IC_{50} アッセイ(30もしくは60分および0分時)において同一であった。

【0453】

色素生産性基質の加水分解の初速度を、両アッセイにおいて、Thermo Max[登録商標]キネティックマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を用いて405nmの吸収の変化で5分間測定したが、そこでは添加した基質の5%未満が使用された。加水分解の初速度の50%減少をもたらすところの添加された阻害剤の濃度を、二つのアッセイ(30もしくは60分および0分時)のそれぞれにおけるそれぞれの IC_{50} 値として定義した。

【0454】

特異性測定のためのインビトロ酵素アッセイ

化合物がマトリプターゼ活性の選択的阻害剤として作用する能力を、マトリプターゼの活性を50%阻害する試験化合物の濃度、即ち上の実施例で説明したような(IC_{50})、を測定すること、およびマトリプターゼについての IC_{50} 値を、以下のセリンプロテアーゼの全てもしくはいくつかについての IC_{50} 値と比較することにより評価した：トロンビン、組換え組織プラスミノゲンアクチベーター(r t - P A)、プラスミン、活性化タンパク質C、キモトリプシン、第X a 因子およびトリプシンである。

全てのアッセイに使用した緩衝液は、HB SA(10mM HEPES、pH7.5、150mM塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミン)であった。

【0455】

IC_{50} 測定のアッセイは、Corningマイクロタイタープレートの適切なウエル中で、50マイクロリットルのHB SA、HB SA中で希釈した(広い濃度範囲をカバー)特定濃度の50マイクロリットルの試験化合物(もしくは V_0 (阻害されない速度)の測定のためのHB SA単独)、HB SAで希釈された50マイクロリットルの酵素を結合させることによって実施した。環境温度で30分のインキュベーションの後、以下に特定した濃度の基質の50マイクロリットルをウエルに添加し、200マイクロリットルの最終総容積を得た。色素生産性基質の加水分解の初速度を、Thermo Max[登録商標]キネティックマイクロプレートリーダーを用いて405nmの吸収の変化で5分間測定したが、そこでは添加した基質の5%未満が使用された。加水分解の初速度の50%減少をもたらすところの添加された阻害剤の濃度を、 IC_{50} 値として定義した。

【0456】

トロンビン(f l l a)アッセイ

酵素活性は色素生産性基質、Pefachrome t P A(CH_3SO_2 DヘキサヒドロチロシンーグリシルーLーアルギニンーpーニトロアニリン、Pentapharm Ltd.より入手)、を用いて測定された。基質を使用前に脱イオン水で水溶液に戻した。精製したヒト α -トロンビンはEnzyme Research Laboratories, Inc.から入手した。全てのアッセイに使用した緩衝液は、HB SA(10mM HEPES、pH7.5、150mM塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミン)であった。

【0457】

HB SA(50 μ L)、 α -トロンビン(50 μ l)(最終酵素濃度は0.1nM)および阻害剤(50 μ l)(広い濃度範囲をカバーする)を適切なウエル中で結合させて、室温で30分インキュベートした後、基質Pefachrome-t-P A(50 μ l)(最終基質濃度は250 μ M、 K_m の約5倍)を添加する、 IC_{50} 測定を実施した。Pefachrome-t-P Aの加水分解の初速度を、Thermo Max[登録商標]キネティックマイクロプレートリーダーを用いて405nmの吸収の変化で5分間測定したが、そこでは添加した基質の5%未満が使用された。加水分解の初速度の50%減少をもたらすところの添加された阻害剤の濃度を、 IC_{50} 値として定義した。

【0458】

第X a 因子

第X a 因子の触媒活性は、DiaPharma Group (Franklin, OH)から入手した色素生産性基質S-2765(N-ベンジルオキシカルボニル-D-アルギニン- L-グリシン- L-アルギニン- p-ニトロアニリン)を用いて測定された。全ての基質を使用前に脱イオン水で水溶液に戻した。S-2765の最終濃度は250 μ M(K_m の約5倍)であった。精製されたヒト第X因子はEnzyme Research Laboratories, Inc. (South Bend, IN)から入手

10

20

30

40

50

し、そして第 X a 因子 (F X a) を、記載にしたがって [Bock, P.E., Craig, P.A., Olson, S.T., and Singh, P. Arch. Biochem. Biophys. 273:375388 (1989)]、それから活性化して、調製した。酵素をアッセイ前に H B S A 中に希釈し、そこでは最終濃度は 0.25 nM であった。

【0459】

組換え組織プラスミノーゲンアクチベーター (r t - P A) アッセイ

r t - P A の触媒活性は、基質 Pefachrome t P A (C H ₃ S O ₂ D ヘキサヒドロチロシニングリシルー L - アルギニン - p - ニトロアニリン、Pentapharm Ltd. より入手) を用いて測定された。アッセイの前に基質を脱イオン水に溶かし、次いで H B S A 中で希釈し、そこでは最終濃度は 500 マイクロモル濃度 (K m の約 3 倍) であった。ヒト r t - P A (Act ivase [登録商標]) は、Genentech Inc. から入手された。酵素を、アッセイの前に脱イオン水で水溶液に戻して、H B S A の中に希釈し、そこでは最終濃度は 1.0 nM であった。

【0460】

プラスミンアッセイ

プラスミンの触媒活性は、DiaPharma group から入手した色素生産性基質 S - 2366 (L - ピログルタミル - L - プロリル - L - アルギニン - p - ニトロアニリン塩酸塩) を用いて測定された。アッセイの前に基質を脱イオン水に溶かし、次いで H B S A 中で希釈して、そこでは最終濃度は 300 マイクロモル濃度 (K m の約 2.5 倍) であった。精製ヒトプラスミンは、Enzyme Research Laboratories, Inc. から入手された。酵素を、アッセイの前に H B S A の中に希釈し、そこでは最終濃度は 1.0 nM であった。

【0461】

活性化タンパク質 C (a P C) アッセイ

a P C の触媒活性は、色素生産性基質 Pefachrome P C (デルターカルボベンジルオキシ - D - リジン - L - プロピル - L - アルギニン - p - ニトロアニリン二塩酸塩、Pentapharm Ltd. より入手) を用いて測定された。アッセイの前に基質を脱イオン水に溶かし、次いで H B S A 中で希釈し、そこでは最終濃度は 400 マイクロモル濃度 (K m の約 3 倍) であった。精製ヒト a P C は、Hematologic Technologies, Inc. から入手された。酵素をアッセイの前に H B S A の中に希釈し、そこでは最終濃度は 1.0 nM であった。

【0462】

キモトリプシンアッセイ

キモトリプシンの触媒活性は、DiaPharma Group から入手した色素生産性基質 S - 2586 (メトキシ - サクシニル - L - アルギニン - L - プロピル - L - チロシル - p - ニトロアニリド) を用いて測定された。アッセイの前に基質を脱イオン水に溶かし、次いで H B S A 中で希釈し、そこでは最終濃度は 100 マイクロモル濃度 (K m の約 9 倍) であった。精製した (3 X 結晶化 ; C D I) ウシ膵臓アルファキモトリプシンは、Worthington Biochemical Corp. から入手された。酵素をアッセイの前に脱イオン水で水溶液に戻し、H B S A の中に希釈し、そこでは最終濃度は 0.5 nM であった。

【0463】

トリプシンアッセイ

トリプシンの触媒活性は、DiaPharma Group から入手した色素生産性基質 S - 2222 (ベンゾイル - L - イソロイシン - L - グルタミン酸 - [ガンマメチルエステル] - L - アルギニン - p - ニトロアニリド) を用いて測定された。アッセイの前に基質を脱イオン水に溶かし、次いで H B S A 中で希釈し、そこでは最終濃度は 250 マイクロモル濃度 (K m の約 4 倍) であった。精製した (3 X 結晶化 ; T R L 3) ウシ膵臓トリプシンは、Worthington Biochemical Corp. から入手された。酵素をアッセイの前に脱イオン水で水溶液に戻し、H B S A の中に希釈し、そこでは最終濃度は 0.5 nM であった。

修飾は当業者に明らかであろうから、本発明は、添付の請求の範囲によってのみ限定されるものとする。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077267 A2

(51) International Patent Classification: C12Q
(21) International Application Number: PCT/US02/09611
(22) International Filing Date: 27 March 2002 (27.03.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
60/279,228 27 March 2001 (27.03.2001) US
60/291,501 15 May 2001 (15.05.2001) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/279,228 (CIP)
Filed on 27 March 2001 (27.03.2001)
US 60/291,501 (CIP)
Filed on 15 May 2001 (15.05.2001)

(71) Applicant (for all designated States except US): CORVAS INTERNATIONAL, INC. [US/US]; 3030 Science Park Road, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MADISON, Edwin, L. [US/US]; 11005 Cedarcrest Way, San Diego, CA 92121 (US). ONG, Edgar, O. [CA/US]; 10738 Glendover Lane, San Diego, CA 92126 (US).

(74) Agents: SEIDMAN, Stephanie, L. et al.; Heller Ehrman White & McAvill LLP, 4350 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 92122-1246 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GU, HK, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NI, NL, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GU, HK, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NI, NL, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GU, HK, HU, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NI, NL, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A TRANSMEMBRANE SERINE PROTEASE 9, THE ENCODED POLYPEPTIDES AND METHODS BASED THEREON

(57) Abstract: Provided herein are type II transmembrane serine protease 9 (MTSP9) polypeptides. Zymogen and activated forms of these polypeptides as well as single and two chain forms of the protease domain are also provided. Methods using the polypeptides to identify compounds that modulate the protease activity of an MTSP9 are provided.

WO 02/077267 A2

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-1-

**NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A TRANSMEMBRANE SERINE
PROTEASE 9, THE ENCODED POLYPEPTIDES AND METHODS BASED THEREON
RELATED APPLICATIONS**

Benefit of priority is claimed to U.S. provisional application Serial No.
5 60/279,228, filed March 27, 2001, Edwin L. Madison and Edgar O. Ong,
entitled "NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING TRANSMEMBRANE SERINE
PROTEASE 9, THE ENCODED PROTEINS AND METHODS BASED THEREON",
and to U.S. provisional application Serial No. 60/291,501, filed May 15, 2001,
to Edwin L. Madison and Edgar O. Ong, entitled "NUCLEIC ACID MOLECULES
10 ENCODING TRANSMEMBRANE SERINE PROTEASE 9, THE ENCODED PROTEINS
AND METHODS BASED THEREON." Where permitted, the subject matter of
each of these application is incorporated in its entirety by reference thereto.

FIELD OF INVENTION

Nucleic acid molecules that encode proteases and portions thereof,
15 particularly protease domains are provided. Also provided are prognostic,
diagnostic and therapeutic methods using the proteases and domains thereof and
the encoding nucleic acid molecules.

BACKGROUND OF THE INVENTION AND OBJECTS THEREOF

Cancer, which is a leading cause of death in the United States, is
20 characterized by an increase in the number of abnormal neoplastic cells, which
proliferate to form a tumor mass, the invasion of adjacent tissues by these
neoplastic tumor cells, and the generation of malignant cells that metastasize via
the blood or lymphatic system to regional lymph nodes and to distant sites.
Among the hallmarks of cancer is a breakdown in the communication among
25 tumor cells and their environment. Normal cells do not divide in the absence of
stimulatory signals and cease dividing in the presence of inhibitory signals.
Growth-stimulatory and growth-inhibitory signals, are routinely exchanged
between cells within a tissue. In a cancerous, or neoplastic, state, a cell
acquires the ability to "override" these signals and to proliferate under conditions
30 in which normal cells do not grow.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-2-

In order to proliferate tumor cells acquire a number of distinct aberrant traits reflecting genetic alterations. The genomes of certain well-studied tumors carry several different independently altered genes, including activated oncogenes and inactivated tumor suppressor genes. Each of these genetic changes appears to be responsible for imparting some of the traits that, in the aggregate, represent the full neoplastic phenotype.

A variety of biochemical factors have been associated with different phases of metastasis. Cell surface receptors for collagen, glycoproteins such as laminin, and proteoglycans, facilitate tumor cell attachment, an important step in invasion and metastases. Attachment triggers the release of degradative enzymes which facilitate the penetration of tumor cells through tissue barriers. Once the tumor cells have entered the target tissue, specific growth factors are required for further proliferation. Tumor invasion and progression involve a complex series of events, in which tumor cells detach from the primary tumor, break down the normal tissue surrounding it, and migrate into a blood or lymphatic vessel to be carried to a distant site. The breaking down of normal tissue barriers is accomplished by the elaboration of specific enzymes that degrade the proteins of the extracellular matrix that make up basement membranes and stromal components of tissues.

A class of extracellular matrix degrading enzymes has been implicated in tumor invasion. Among these are the matrix metalloproteinases (MMP). For example, the production of the matrix metalloproteinase stromelysin is associated with malignant tumors with metastatic potential (see, e.g., McDonnell *et al.* (1990) *Smnrs. in Cancer Biology* 1:107-115; McDonnell *et al.* (1990) *Cancer and Metastasis Reviews* 9:309-319).

The capacity of cancer cells to metastasize and invade tissue is facilitated by degradation of the basement membrane. Several proteinase enzymes, including the MMPs, have been reported to facilitate the process of invasion of tumor cells. MMPs are reported to enhance degradation of the basement membrane, which thereby permits tumorous cells to invade tissues. For example, two major metalloproteinases having molecular weights of about 70 kDa and 92 kDa appear to enhance ability of tumor cells to metastasize.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-3-

Type II Transmembrane Serine Proteases (TTSPs)

In addition to the MMPs, serine proteases have been implicated in neoplastic disease progression. Most serine proteases, which are either secreted enzymes or are sequestered in cytoplasmic storage organelles, have roles in blood coagulation, wound healing, digestion, immune responses and tumor invasion and metastasis. A class of cell surface proteins designated type II transmembrane serine proteases, which are membrane-anchored proteins with additional extracellular domains, has been identified. As cell surface proteins, they are positioned to play a role in intracellular signal transduction and in mediating cell surface proteolytic events.

Cell surface proteolysis is a mechanism for the generation of biologically active proteins that mediate a variety of cellular functions. Membrane-associated proteases include membrane-type metalloproteinases (MT-MMP), ADAMs (proteases that contain disintegrin-like and metalloproteinase domains) and the TTSPs. In mammals, at least 17 members of the TTSP family are known, including seven in humans (see, Hooper *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:857-860). These include: corin (accession nos. AF133845 and AB013874; see, Yan *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:14926-14938; Tomia *et al.* (1998) *J. Biochem.* 124:784-789; Uan *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:8525-8529); enterpeptidase (also designated enterokinase; accession no. U09860 for the human protein; see, Kitamoto *et al.* (1995) *Biochem.* 27: 4562-4568; Yahagi *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219:806-812; Kitamoto *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:7588-7592; Matsushima *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:19976-19982;); human airway trypsin-like protease (HAT; accession no. AB002134; see Yamaoka *et al.* *J. Biol. Chem.* 273:11894-11901); MTSP1 and matriptase (also called TADG-15; see SEQ ID Nos. 1 and 2; accession nos. AF133086/AF118224, AF04280022; Takeuchi *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:11054-11161; Lin *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18231-18236; Takeuchi *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:26333-26342; and Kim *et al.* (1999) *Immunogenetics* 49:420-429); hepsin (see, accession nos. M18930, AF030065, X70900; Leytus *et al.* (1988) *Biochem.* 27: 11895-11901; Vu *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:31315-31320;

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-4-

and Farley *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Acta* 1173:350-362; and see, U.S. Patent No. 5,972,616; TMPRS2 (see, Accession Nos. U75329 and AF113596; Paoloni-Giacobino *et al.* (1997) *Genomics* 44:309-320; and Jacquinet *et al.* (2000) *FEBS Lett.* 468: 93-100); and TMPRSS4 (see, Accession No. NM

5 016425; Wallrapp *et al.* (2000) *Cancer* 60:2602-2606).

Serine proteases, including transmembrane serine proteases and secreted proteases, have been implicated in processes involved in neoplastic development and progression. While the precise, detailed mechanism by which these proteases promote tumor growth and progression has not been elaborated, serine proteases and inhibitors thereof are involved in the control of many intra- and extracellular physiological processes, including degradative actions in cancer cell invasion, metastatic spread, and neovascularization of tumors, that are involved in tumor progression. It is believed that proteases are involved in the degradation of extracellular matrix (ECM) and contribute to tissue remodeling, and are necessary for cancer invasion and metastasis. The activity and/or expression of some proteases have been shown to correlate with tumor progression and development.

For example, a membrane-type serine protease MTSP1 (also called matriptase; see SEQ ID Nos. 1 and 2 from U.S. Patent No. 5,972,616; and GenBank Accession No. AF118224; (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18231-18236; U.S. Patent No. 5,792,616; see, also Takeuchi (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:11054-1161) that is expressed in epithelial cancer and normal tissue (Takeuchi *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11054-61) has been identified. Matriptase was originally identified in human breast cancer cells as a major gelatinase (see, U.S. Patent No. 5,482,848) and was initially believed to be a type of matrix metalloprotease (MMP). It has been proposed that it plays a role in the metastasis of breast cancer. Matriptase also is expressed in a variety of epithelial tissues with high levels of activity and/or expression in the human gastrointestinal tract and the prostate. MTSPs, designated MTSP3, MTSP4, MTSP6 have been described in published International PCT application No. WO 01/57194, based in International PCT application No. PCT/US01/03471.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-5-

Prostate-specific antigen (PSA), a kallikrein-like serine protease, degrades extracellular matrix glycoproteins fibronectin and laminin, and, has been postulated to facilitate invasion by prostate cancer cells (Webber *et al.* (1995) *Clin. Cancer Res.*, 1(10):1089-94). Blocking PSA proteolytic activity with

5 PSA-specific monoclonal antibodies results in a dose-dependent decrease *in vitro* in the invasion of the reconstituted basement membrane Matrigel by LNCaP human prostate carcinoma cells which secrete high levels of PSA.

Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer (Tanimoto *et al.* (1997) *Cancer Res.*, 57(14):2884-7). The hepsin transcript appears to be abundant in carcinoma tissue and is almost never expressed in normal adult tissue, including normal

10 ovary. It has been suggested that hepsin is frequently overexpressed in ovarian tumors and therefore can be a candidate protease in the invasive process and growth capacity of ovarian tumor cells.

A serine protease-like gene, designated normal epithelial cell-specific 1 (NES1) (Liu *et al.*, *Cancer Res.*, 56(14):3371-9 (1996)) has been identified. Although expression of the NES1 mRNA is observed in all normal and immortalized nontumorigenic epithelial cell lines, the majority of human breast cancer cell lines show a drastic reduction or a complete lack of its expression.

20 The structural similarity of NES1 to polypeptides known to regulate growth factor activity and a negative correlation of NES1 expression with breast oncogenesis suggest a direct or indirect role for this protease-like gene product in the suppression of tumorigenesis.

Hence transmembrane serine proteases appear to be involved in the

25 etiology and pathogenesis of tumors. There is a need to further elucidate their role in these processes and to identify additional transmembrane proteases. Therefore, it is an object herein to provide transmembrane serine protease (MTSP) proteins and nucleic acids encoding such MTSP proteases that are involved in the regulation of or participate in tumorigenesis and/or

30 carcinogenesis. It is also an object herein to provide prognostic, diagnostic and therapeutic screening methods using such proteases and the nucleic acids encoding such proteases.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-6-

SUMMARY OF THE INVENTION

Provided herein are members of the Transmembrane Serine Protease family, particularly the Type II Transmembrane Serine Protease (TTSP) family (also referred to herein as MTSPs), and more particularly TTSP family members whose functional activity and/or expression differs in tumor cells from non-tumor cells in the same tissue. The MTSP provided herein is a MTSP family member, designated herein as MTSP9. The protease domain and full-length protein, including the zymogen and activated forms, and uses thereof are also provided. Proteins encoded by splice variants are also provided.

Assays for identifying effectors, such as compounds, including small molecules, and conditions, such pH, temperature and ionic strength, that modulate the activation, expression or activity of MTSP9 are also provided herein. In exemplary assays, the effects of test compounds on the ability of a protease domain of MTSP9 to proteolytically cleave a known substrate, typically a fluorescently, chromogenically or otherwise detectably labeled substrate, are assessed. Agents, generally compounds, particularly small molecules, that modulate the activity of the protease domain are candidate compounds for modulating the activity of the MTSP9. The protease domains can also be used to produce protease-specific antibodies. The protease domains provided herein include, but are not limited to, the single chain region having an N-terminus at the cleavage site for activation of the zymogen, through the C-terminus, or C-terminal truncated portions thereof that exhibit proteolytic activity as a single-chain polypeptide *in vitro* proteolysis assays, of any MTSP family member, including MTSP9, generally from a mammal, including human, that, for example, is expressed in tumor cells at different levels from non-tumor cells.

Nucleic acid molecules encoding the proteins and protease domains are also provided. Nucleic acid molecules that encode a single-chain protease domain or catalytically active portion thereof and also those that encode the full-length MTSP9 are provided. Nucleic acid encoding the protease domain (nucleotides 31-729) and upstream nucleic acid in SEQ ID No. 5; and the protease domain of MTSP9 is set forth in SEQ ID No. 6 (amino acids 11-232)

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-7-

and in SEQ ID No. 16. The protein sequence and encoding nucleic acid sequence of the full-length MTSP9 are set forth in SEQ ID Nos. 18 and 17.

Also provided are nucleic acid molecules that hybridize to such MTSP9-encoding nucleic acid along their full-length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full-length and encode the protease domain or portion thereof are provided. Hybridization is generally effected under conditions of at least low, generally at least moderate, and often high stringency.

The isolated nucleic acid fragment is DNA, including genomic or cDNA, or is RNA, or can include other components, such as protein nucleic acid or other nucleotide analogs. The isolated nucleic acid may include additional components, such as heterologous or native promoters, and other transcriptional and translational regulatory sequences, these genes may be linked to other genes, such as reporter genes or other indicator genes or genes that encode indicators.

Also provided is an isolated nucleic acid molecule that includes the sequence of molecules that is complementary to the nucleotide sequence encoding MTSP9 or the portion thereof.

Also provided are fragments thereof or oligonucleotides that can be used as probes or primers and that contain at least about 10, 14, 16 nucleotides, generally less than 1000 or less than or equal to 100, set forth in SEQ ID No. 5 or 17 (or the complement thereof); or contain at least about 30 nucleotides (or the complement thereof) or contain oligonucleotides that hybridize along their full-length (or at least about 70, 80 or 90% thereof) to any such fragments or oligonucleotides. The length of the fragments are a function of the purpose for which they are used and/or the complexity of the genome of interest. Generally probes and primers contain less than about 50, 150 or 500 nucleotides.

Also provided are plasmids containing any of the nucleic acid molecules provided herein. Cells containing the plasmids are also provided. Such cells include, but are not limited to, bacterial cells, yeast cells, fungal cells, plant cells, insect cells and animal cells.

Also provided is a method of producing MTSP9 by growing the above-described cells under conditions whereby the MTSP9 is expressed by the cells,

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-8-

and recovering the expressed MTSP9 polypeptide. Methods for isolating nucleic acid encoding other MTSP9s are also provided.

Also provided are cells, generally eukaryotic cells, such as mammalian cells and yeast cells, in which the MTSP9 polypeptide is expressed on the surface of the cells. Such cells are used in drug screening assays to identify compounds that modulate the activity of the MTSP9 polypeptide. These assays, including *in vitro* binding assays, and transcription based assays in which signal transduction mediated directly or indirectly, such as via activation of pro-growth factors, by the MTSP9 is assessed.

Also provided are peptides that are encoded by such nucleic acid molecules. Included among those polypeptides are the MTSP9 protease domain or a polypeptide with amino acid changes such that the specificity and/or protease activity remains substantially unchanged. In particular, a substantially purified mammalian MTSP9 polypeptide is provided that includes a serine protease catalytic domain and may additionally include other domains. The MTSP9 can form homodimers and can also form heterodimers with some other protein, such as a membrane-bound protein. Also provided is a substantially purified protein including a sequence of amino acids that has at least 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% identity to the MTSP9 where the percentage identity is determined using standard algorithms and gap penalties that maximize the percentage identity. A human MTSP9 polypeptide is exemplified, although other mammalian MTSP9 polypeptides are contemplated. Splice variants of the MTSP9, particularly those with a proteolytically active protease domain, are contemplated herein.

In other embodiments, substantially purified polypeptides that include a protease domain of a MTSP9 polypeptide or a catalytically active portion thereof, but that do not include the entire sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 18 are provided. Among these are polypeptides that include a sequence of amino acids that has at least 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% or 100% sequence identity to SEQ ID No. 16 or 18.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-9-

In a specific embodiment, a nucleic acid that encodes a MTSP, designated MTSP9 is provided. In particular, the nucleic acid includes the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5, particularly set forth as nucleotides 31-729 of SEQ ID No. 5, or SEQ ID No. 17 or a portion thereof that encodes a catalytically active polypeptide.

Also provided are nucleic acid molecules that hybridize under conditions of at least low stringency, generally moderate stringency, more typically high stringency to the SEQ ID No. 5 or 17 or degenerates thereof.

In one embodiment, the isolated nucleic acid fragment hybridizes to a nucleic acid molecule containing the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No: 5 or 17 (or degenerates thereof) under high stringency conditions, in one embodiment contains the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID Nos. 5 and 17. A full-length MTSP9 is set forth in SEQ ID No. 18 and is encoded by SEQ ID No. 17 or degenerates thereof.

Also provided are muteins of the single chain protease domain of MTSP9 particularly muteins in which the Cys residue in the protease domain that is free (*i.e.*, does not form disulfide linkages with any other Cys residue in the protease domain) is substituted with another amino acid substitution, typically, although not necessarily, with a conservative amino acid substitution or a substitution that does not eliminate the activity, and muteins in which a glycosylation site(s) is eliminated.

Hence muteins in which one or more of the Cys residues, particularly, a residue that is paired in the activated two form, but unpaired in the protease domain alone (*i.e.*, the Cys a residue position 26 (see SEQ ID Nos. 5, 6 and 16) in the protease domain), is/are replaced with any amino acid, typically, although not necessarily, a conservative amino acid residue, such as Ser, are contemplated. Muteins of MTSP9, particularly those in which Cys residues, such as the unpaired Cys in the single chain protease domain, is replaced with another amino acid that does not eliminate the activity, are provided. Muteins in which other

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-10-

conservative or non-conservative amino acid substitutions in which catalytic activity is retained are also contemplated (see, *e.g.*, Table 1, for exemplary amino acid substitutions).

MTSP9 polypeptides, including, but not limited to splice variants thereof, and nucleic acids encoding MTSPs, and domains, derivatives and analogs thereof are provided herein. Single chain protease domains that have an N-terminus functionally equivalent to that generated by activation of the zymogen form of MTSP9 are also provided. The cleavage site for the protease domain of MTSP9 is between amino acid R₁₈₈ and amino acid I₁₈₇ (RIASG). There are two potential glycosylation sites at N₁₈₃ and N₃₀₉. Disulfide bonds form between the Cys residues C₁₇₆-C₂₈₂ to link the protease domain to another domain so that upon cleavage the resulting polypeptide is a two chain molecule. There are potential disulfide bonds as follows: C₂₁₂-C₂₂₈, C₃₃₇-C₃₈₃ and C₃₆₄-C₃₉₃. Hence C₂₈₂ is a free Cys in the single chain form of the protease domain, which can also be provided as a two chain molecule. It is shown herein, however, that the single chain and two chain forms are proteolytically active.

Hence, provided herein is a the family of transmembrane serine protease (MTSP) proteins designated MTSP9, and functional domains, especially protease (or catalytic) domains thereof, muteins and other derivatives and analogs thereof. Also provided herein are nucleic acids encoding the MTSP9s.

MTSPs are of interest because they appear to be expressed and/or activated at different levels in tumor cells from normal cells, or have functional activity that is different in tumor cells from normal cells, such as by an alteration in a substrate therefor, or a cofactor. MTSP9 is of interest because it is expressed or is active in tumor cells. Hence the MTSPs provided herein can serve as diagnostic markers for certain tumors.

Of interest herein are MTSPs that are expressed or are activated in certain tumor or cancer cells such lung, prostate, colon and breast cancers. In particular, it is shown herein, that MTSP9 is expressed and/or activated in a variety of tumor cells, including, for example, in lung carcinoma, leukemia and cervical carcinoma as well as in certain normal cells and tissues (see *e.g.*, EXAMPLES for tissue-specific expression profile). MTSP9 also can be a marker

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-11-

for breast, prostate and colon cancer. The expression and/or activation of MTSP9 on or in the vicinity of a cell or in a bodily fluid in a subject can be a marker for breast, prostate, lung, colon and other cancers.

In certain embodiments, the MTSP9 polypeptide is detectable in a body fluid at a level that differs from its level in body fluids in a subject not having a tumor. In other embodiments, the polypeptide is present in a tumor; and a substrate or cofactor for the polypeptide is expressed at levels that differ from its level of expression in a non-tumor cell in the same type of tissue. In other embodiments, the level of expression and/or activity of the MTSP9 polypeptide in tumor cells differs from its level of expression and/or activity in non-tumor cells. In other embodiments, the MTSP9 is present in a tumor; and a substrate or cofactor for the MTSP9 is expressed at levels that differ from its level of expression in a non-tumor cell in the same type of tissue.

Also provided are methods for screening for compounds that modulate the activity of MTSP9. The compounds are identified by contacting them with the MTSP9 or protease domain thereof and a substrate for the MTSP9. A change in the amount of substrate cleaved in the presence of the compounds compared to that in the absence of the compound indicates that the compound modulates the activity of the MTSP9. Such compounds are selected for further analyses or for use to modulate the activity of the MTSP9, such as inhibitors or agonists. The compounds can also be identified by contacting the substrates with a cell that expresses the MTSP9 or the extracellular domain or proteolytically active portion thereof.

Also provided herein are methods of modulating the activity of the MTSP9 and screening for compounds that modulate, including inhibit, antagonize, agonize or otherwise alter the activity of the MTSP9. Of particular interest is the extracellular domain of MTSP9 that includes the proteolytic (catalytic) portion of the protein.

Cells, combinations, kits and articles of manufacture containing the MTSP9 polypeptides, domains thereof, or encoding nucleic acids are also provided herein. Methods of expressing the encoded MTSP9 polypeptide and portions thereof using the cells are also provided, as are cells that express

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-12-

MTSP9 on the cell surface. Such cells are used in methods of identifying candidate therapeutic compounds.

Additionally provided herein are antibodies that specifically bind to single and two chains forms of MTSP9, cells, combinations, kits and articles of manufacture that contain the antibodies. Antibodies that specifically bind to the MTSP9, particularly the single-chain protease domain, the two-chain form of the protease domain, the zymogen and activated form of MTSP9 and other fragments thereof. Neutralizing antibodies that inhibit a biological activity, particularly protease activity are also provided.

10 Further provided herein are prognostic, diagnostic, therapeutic screening methods using MTSP9 and the nucleic acids encoding MTSP9. In particular, the prognostic, diagnostic and therapeutic screening methods are used for preventing, treating, or for finding agents useful in preventing or treating, tumors or cancers such as lung carcinoma, colon adenocarcinoma and ovarian
15 carcinoma.

Also provided herein are modulators of the activity of MTSP9, especially the modulators obtained according to the screening methods provide herein. Such modulators can have use in treating cancerous conditions and other neoplastic conditions.

20 Methods of diagnosing a disease or disorder characterized by detecting an aberrant level of an MTSP9 in a subject is provided. The method can be practiced by measuring the level of the DNA, RNA, protein or functional activity of the MTSP9. An increase or decrease in the level of the DNA, RNA, protein or functional activity of the MTSP, relative to the level of the DNA, RNA, protein or
25 functional activity found in an analogous sample not having the disease or disorder (or other suitable control) is indicative of the presence of the disease or disorder in the subject or other relative any other suitable control.

Also provided are methods of identifying a compound that binds to the single-chain and/or two-chain form of MTSP9, by contacting a test compound
30 with a both forms; determining to which form the compound binds; and if it binds to a form of MTSP9, further determining whether the compound has at least one of the following properties:

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-13-

- (i) inhibits activation of the single-chain zymogen form of MTSP9;
- (ii) inhibits activity of the two-chain or single-chain form; and
- (iii) inhibits dimerization of the protein.

The forms can be full length or truncated forms, including but not limited to, the
 5 protease domain resulting from cleavage at the activation cleavage site (between
 amino acids R₁₈₅ and I₁₈₆); or from expression of the protease domain or
 catalytically active portions thereof.

Pharmaceutical composition containing the protease domain and/or full-
 length or other domain of an MTSP9 polypeptide are provided herein in a
 10 pharmaceutically acceptable carrier or excipient are provided herein.

Also provided are articles of manufacture that contain MTSP9
 polypeptide and protease domains of MTSP9 in single chain forms or activated
 forms. The articles contain a) packaging material; b) the polypeptide (or
 encoding nucleic acid), particularly the single chain protease domain thereof; and
 15 c) a label indicating that the article is for using ins. assays for identifying
 modulators of the activities of an MTSP9 polypeptide is provided herein.

Conjugates containing a) an MTSP9 polypeptide or protease domain in a
 single or two chain form; and b) a targeting agent linked to the MTSP directly or
 via a linker, wherein the agent facilitates: i) affinity isolation or purification of the
 20 conjugate; ii) attachment of the conjugate to a surface; iii) detection of the
 conjugate; or iv) targeted delivery to a selected tissue or cell, is provided herein.
 The conjugate can contain a plurality of agents linked thereto. The conjugate
 can be a chemical conjugate; and it can be a fusion protein. The targeting agent
 can be a protein or peptide fragment. The protein or peptide fragment can
 25 include a protein binding sequence, a nucleic acid binding sequence, a lipid
 binding sequence, a polysaccharide binding sequence, or a metal binding
 sequence.

Combinations are provided herein. The combination can include: a) an
 inhibitor of the activity of an MTSP9; and b) an anti-cancer treatment or agent.
 30 The MTSP inhibitor and the anti-cancer agent can be formulated in a single
 pharmaceutical composition or each is formulated in a separate pharmaceutical
 composition. The MTSP9 inhibitor can be an antibody or a fragment or binding

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-14-

portion thereof made against the MTSP9, such as an antibody that specifically binds to the protease domain, an inhibitor of MTSP9 production, or an inhibitor of MTSP9 membrane-localization or an inhibitor of MTSP9 activation. Other MTSP9 inhibitors include, but are not limited to, an antisense nucleic acid or double-stranded RNA (dsRNA), such as RNAi, encoding the MTSP9, particularly a portion of the protease domain; a nucleic acid encoding at least a portion of a gene encoding the MTSP9 with a heterologous nucleotide sequence inserted therein such that the heterologous sequence inactivates the biological activity encoded MTSP9 or the gene encoding it. For example, the portion of the gene encoding the MTSP9 can flank the heterologous sequence to promote homologous recombination with a genomic gene encoding the MTSP9.

Also provided are methods for treating or preventing a tumor or cancer in a mammal by administering to a mammal an effective amount of an inhibitor of an MTSP9, whereby the tumor or cancer is treated or prevented. The MTSP9 inhibitor used in the treatment or for prophylaxis is administered with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. The mammal treated can be a human. The treatment or prevention method can additionally include administering an anti-cancer treatment or agent simultaneously with or subsequently or before administration of the MTSP9 inhibitor.

Also provided are transgenic non-human animals bearing inactivated genes encoding the MTSP and bearing the genes encoding the MTSP9 under non-native promoter control are provided. Such animals are useful in animal models of tumor initiation, growth and/or progression models. Transgenic non-human animals containing heterologous nucleic acid MTSP9 under native, non-native promoter control or on an exogenous element, such as a plasmid or artificial chromosome, are additionally provided herein. In particular, recombinant non-human animals are provided herein, where the gene of an MTSP9 is under control of a promoter that is not the native promoter of the gene or that is not the native promoter of the gene in the non-human animal or where the nucleic acid encoding the MTSP9 is heterologous to the non-human animal and the promoter is the native or a non-native promoter or the MTSP9 is on an extrachromosomal element, such as a plasmid or artificial chromosome.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-15-

Recombinant and transgenic animals can be produced by homologous recombination and non-homologous recombination methods.

Methods of gene therapy are provided. Such methods can be effected administering *in vivo* or *ex vivo* an inactivating form of the MTSP9 or by
5 administering an MTSP-encoding nucleic acid molecule are also provided.

Also provided are methods of treatments of tumors by administering a prodrug that is activated by MTSP9 that is expressed or active in tumor cells, particularly those in which its functional activity in tumor cells is greater than in
10 MTSP9 expressed on cells cleaves the prodrug and releases active drug in the vicinity of the tumor cells. The active anti-cancer drug accumulates in the vicinity of the tumor. This is particularly useful in instances in which MTSP9 is expressed or active in greater quantity, higher level or predominantly in tumor cells compared to other cells.

Also provided are methods of diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, a malignancy, or other pathologic condition in a subject, by obtaining a biological sample from the subject; exposing it to a detectable agent that binds
15 to a two-chain and/or single-chain form of MTSP9, where the pathological condition is characterized by the presence or absence of the two-chain and/or single-chain form.
20

Methods of inhibiting tumor invasion or metastasis or treating a malignant or pre-malignant condition by administering an agent that inhibits activation of the zymogen form of MTSP9 or an activity of the activated form are provided. The conditions include, but are not limited to, a condition, such as a tumor, of
25 the breast, cervix, prostate, lung, ovary or colon.

DETAILED DESCRIPTION

A. DEFINITIONS

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as is commonly understood by one of skill in the art to
30 which the invention(s) belong. All patents, patent applications, published applications and publications, Genbank sequences, websites and other published materials referred to throughout the entire disclosure herein, unless noted

otherwise, are incorporated by reference in their entirety. In the event that there are a plurality of definitions for terms herein, those in this section prevail.

Where reference is made to a URL or other such identifier or address, it is understood that such identifiers can change and particular information on the internet can come and go, but equivalent information can be found by searching the internet. Reference thereto evidences the availability and public dissemination of such information.

As used herein, the abbreviations for any protective groups, amino acids and other compounds, are, unless indicated otherwise, in accord with their common usage, recognized abbreviations, or the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (see, (1972) *Biochem. 11*:942-944).

As used herein, serine protease refers to a diverse family of proteases wherein a serine residue is involved in the hydrolysis of proteins or peptides. The serine residue can be part of the catalytic triad mechanism, which includes a serine, a histidine and an aspartic acid in the catalysis, or be part of the hydroxyl/ε-amine or hydroxyl/α-amine catalytic dyad mechanism, which involves a serine and a lysine in the catalysis. Of particular interest are SPs of mammalian, including human, origin. Those of skill in this art recognize that, in general, single amino acid substitutions in non-essential regions of a polypeptide do not substantially alter biological activity (see, *e.g.*, Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224).

As used herein, "transmembrane serine protease (MTSP)" refers to a family of transmembrane serine proteases that share common structural features as described herein (see, also Hooper *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:857-860). Thus, reference, for example, to "MTSP" encompasses all proteins encoded by the MTSP gene family, including but are not limited to: MTSP3, MTSP4, MTSP6, MTSP7 or an equivalent molecule obtained from any other source or that has been prepared synthetically or that exhibits the same activity. Other MTSPs include, but are not limited to, corin, enterpeptidase, human airway trypsin-like protease (HAT), MTSP1, TMPRSS2 and TMPRSS4. Sequences of encoding nucleic acid molecules and the encoded amino acid sequences of

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-17-

exemplary MTSPs and/or domains thereof are set forth, for example in U.S. application Serial No. 09/776,191 (SEQ ID Nos. 1-12, 49, 50 and 61-72 therein, published as International PCT application No. WO 01/57194). The term also encompass MTSPs with amino acid substitutions that do not substantially alter activity of each member and also encompasses splice variants thereof. Suitable substitutions, including, although not necessarily, conservative substitutions of amino acids, are known to those of skill in this art and can be made without eliminating the biological activity, such as the catalytic activity, of the resulting molecule.

10 As used herein an MTSP9, whenever referenced herein, includes at least one or all of or any combination of:

a polypeptide encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 17 or by a sequence of nucleotides that includes nucleotides that encode amino acids 11-232 of SEQ ID No. 6;

15 a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of low, moderate or high stringency to the sequence of nucleotides set forth in is set forth as nucleotides 31-729 SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

20 a polypeptide that includes the sequence of amino acids set forth as amino acids 11-232 of SEQ ID No. 6;

a polypeptide that includes a sequence of amino acids having at least about 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 17 or 18 or as amino acids 11-232 of SEQ ID No. 6; and/or

a polypeptide encoded by a splice variant of the MTSP9 set forth in SEQ ID No. 17.

30 In particular, the MTSP9 polypeptide, with the protease domains as indicated in SEQ ID No. 5, 6, 16, 17 and 18, is provided. The polypeptide is a single or two chain polypeptide. Smaller portions thereof that retain protease activity are also provided. The protease domains from MTSPs vary in size and constitution, including insertions and deletions in surface loops. They retain

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-18-

conserved structure, including at least one of the active site triad (see, *e.g.*, the catalytic triad of the MTSP9 in SEQ ID No. 18 is H₂₂₇, D₂₇₂ and S₃₈₈), primary specificity pocket, oxyanion hole and/or other features of serine protease domains of proteases. Thus, for purposes herein, the protease domain is a portion of an MTSP, as defined herein, and is homologous to a domain of other MTSPs, such as corin, enterpeptidase, human airway trypsin-like protease (HAT), MTSP1, TMPRSS2, and TMPRSS4, which have been previously identified; it was not recognized, however, that an isolated single chain form of the protease domain could function proteolytically in *in vitro* assays. As with the larger class of enzymes of the chymotrypsin (S1) fold (see, *e.g.*, Internet accessible MEROPS data base), the MTSPs protease domains share a high degree of amino acid sequence identity. The His, Asp and Ser residues necessary for activity are present in conserved motifs. The activation site, which results in the N-terminus of the second chain in the two chain form is located in a conserved motif and readily can be identified.

The MTSP9 can be from any animal, particularly a mammal, and includes but are not limited to, humans, rodents, fowl, ruminants and other animals. The full-length zymogen or two-chain activated form is contemplated or any domain thereof, including the protease domain, which can be a two-chain activated form, or a single chain form.

As used herein, a "protease domain of an MTSP" refers to an extracellular protease domain of an MTSP that exhibits proteolytic activity and shares homology and structural features with the chymotrypsin/trypsin family protease domains. Hence it is at least the minimal portion of the domain that exhibits proteolytic activity as assessed by standard *in vitro* assays. Contemplated herein are such protease domains and catalytically active portions thereof. Also provided are truncated forms of the protease domain that include the smallest fragment thereof that acts catalytically as a single chain form.

A protease domain of an MTSP9, whenever referenced herein, includes at least one or all of or any combination of or a catalytically active portion of:
a polypeptide that includes the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 16 ;

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-19-

a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of low, moderate or high stringency to the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 15 or 17;

a polypeptide that includes the sequence of amino acids set forth
5 in SEQ ID No. 6, 16 or 18;

a polypeptide that includes a sequence of amino acids having at least about 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6,
10 16; or 18; and/or

a protease domain of a polypeptide encoded by a splice variant of the MTSP9.

The protease domains of MTSPs vary in size and constitution, including insertions and deletions in surface loops. They retain conserved structure,
15 including at least one of the active site triad, primary specificity pocket, oxyanion hole and/or other features of serine protease domains of proteases. Thus, for purposes herein, the protease domain is a portion of an MTSP, as defined herein, and is homologous to a domain of other MTSP. As with the larger class of enzymes of the chymotrypsin (S1) fold (see, *e.g.*, Internet
20 accessible MEROPS data base), the MTSP protease domains share a high degree of amino acid sequence identity. The His, Asp and Ser residues necessary for activity are present in conserved motifs. The activation site, whose cleavage creates the N-terminus of the protease domain in the two-chain forms is located in a conserved motif and readily can be identified.

25 By active form is meant a form active *in vivo* and/or *in vitro*. As described herein, the protease domain also can exist as a two-chain form. It is shown herein that, at least *in vitro*, the single chain forms of the SPs and the catalytic domains or proteolytically active portions thereof (typically C-terminal truncations) exhibit protease activity. Hence provided herein are isolated single
30 chain forms of the protease domains of SPs and their use in *in vitro* drug screening assays for identification of agents that modulate the activity thereof.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-20-

As used herein, the catalytically active domain of an MTSP refers to the protease domain. Reference to the protease domain of an MTSP generally refers to the single chain form of the protein. If the two-chain form or both forms is intended, it is so-specified. The zymogen form of each protein is a single chain, which is converted to the active two chain form by activation cleavage.

As used herein, activation cleavage refers to the cleavage of the protease at the N-terminus of the protease domain (in this instance between R₁₈₅ and I₁₈₆; with reference to SEQ ID Nos. 12 and 13). By virtue of the Cys-Cys pairing between a Cys outside the protease domain (in this instance, for example C₁₇₅) and a Cys in the protease domain (in this instance Cys₂₅₂) upon cleavage the resulting polypeptide has two chains ("A" chain and the "B" chain, which is the protease domain). Cleavage can be effected by another protease or autocatalytically.

As used herein, a two-chain form of the protease domain refers to a two-chain form that is formed from the two-chain form of the protease in which the Cys pairing between, in this instance, Cys₁₇₅ and Cys₂₅₂, which links the protease domain to the remainder of the polypeptide, the "A" chain. A two chain protease domain form refers to any form in which the "remainder of the polypeptide", *i.e.*, "A" chain, is shortened and includes from at Cys₁₇₅.

MTSPs of interest include those that are activated and/or expressed in tumor cells different, typically higher, from those in non-tumor cells; and those from cells in which substrates therefor differ in tumor cells from non-tumor cells or differ with respect to substrates, co-factors or receptors, or otherwise alter the activity or specificity of the MTSP.

*F*F As used herein, a human protein is one encoded by nucleic acid, such as DNA, present in the genome of a human, including all allelic variants and conservative variations as long as they are not variants found in other mammals.

As used herein, a "nucleic acid encoding a protease domain or catalytically active portion of a SP" shall be construed as referring to a nucleic acid encoding only the recited single chain protease domain or active portion thereof, and not the other contiguous portions of the SP as a continuous sequence.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-21-

As used herein, catalytic activity refers to the activity of the SP as a serine protease. Function of the SP refers to its function in tumor biology, including promotion of or involvement in initiation, growth or progression of tumors, and also roles in signal transduction. Catalytic activity refers to the activity of the SP as a protease as assessed in *in vitro* proteolytic assays that detect proteolysis of a selected substrate.

As used herein, a zymogen is an inactive precursor of a proteolytic enzyme. Such precursors are generally larger, although not necessarily larger than the active form. With reference to serine proteases, zymogens are converted to active enzymes by specific cleavage, including catalytic and autocatalytic cleavage, or by binding of an activating co-factor, which generates the an active enzyme. A zymogen, thus, is an enzymatically inactive protein that is converted to a proteolytic enzyme by the action of an activator.

As used herein, "disease or disorder" refers to a pathological condition in an organism resulting from, *e.g.*, infection or genetic defect, and characterized by identifiable symptoms.

As used herein, neoplasm (neoplasia) refers to abnormal new growth, and thus means the same as *tumor*, which can be benign or malignant. Unlike *hyperplasia*, neoplastic proliferation persists even in the absence of the original stimulus.

As used herein, neoplastic disease refers to any disorder involving cancer, including tumor development, growth, metastasis and progression.

As used herein, cancer refers to a general term for diseases caused by any type of malignant tumor.

As used herein, malignant, as applies to tumors, refers to primary tumors that have the capacity of *metastasis* with loss of *growth control* and *positional control*.

As used herein, an anti-cancer agent (used interchangeable with "anti-tumor or anti-neoplastic agent") refers to any agents used in the anti-cancer treatment. These include any agents, when used alone or in combination with other compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-22-

associated with neoplastic disease, tumor and cancer, and can be used in methods, combinations and compositions provided herein. Non-limiting examples of anti-neoplastic agents include anti-angiogenic agents, alkylating agents, antimetabolites, certain natural products, platinum coordination
5 complexes, anthracenediones, substituted ureas, methylhydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, certain hormones, antagonists and anti-cancer polysaccharides.

As used herein, a splice variant refers to a variant produced by differential processing of a primary transcript of genomic nucleic acid, such as DNA, that
10 results in more than one type of mRNA. Splice variants of SPs are provided herein.

As used herein, angiogenesis is intended to broadly encompass the totality of processes directly or indirectly involved in the establishment and maintenance of new vasculature (neovascularization), including, but not limited
15 to, neovascularization associated with tumors.

As used herein, anti-angiogenic treatment or agent refers to any therapeutic regimen and compound, when used alone or in combination with other treatment or compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic
20 markers associated with undesired and/or uncontrolled angiogenesis. Thus, for purposes herein an anti-angiogenic agent refers to an agent that inhibits the establishment or maintenance of vasculature. Such agents include, but are not limited to, anti-tumor agents, and agents for treatments of other disorders associated with undesirable angiogenesis, such as diabetic retinopathies,
25 restenosis, hyperproliferative disorders and others.

As used herein, non-anti-angiogenic anti-tumor agents refer to anti-tumor agents that do not act primarily by inhibiting angiogenesis.

As used herein, pro-angiogenic agents are agents that promote the establishment or maintenance of the vasculature. Such agents include agents
30 for treating cardiovascular disorders, including heart attacks and strokes.

As used herein, undesired and/or uncontrolled angiogenesis refers to pathological angiogenesis wherein the influence of angiogenesis stimulators

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-23-

outweighs the influence of angiogenesis inhibitors. As used herein, deficient angiogenesis refers to pathological angiogenesis associated with disorders where there is a defect in normal angiogenesis resulting in aberrant angiogenesis or an absence or substantial reduction in angiogenesis.

5 As used herein, the protease domain of an SP protein refers to the protease domain of an SP that exhibits proteolytic activity. Hence it is at least the minimal portion of the protein that exhibits proteolytic activity as assessed by standard assays *in vitro*. It refers, herein, to a single chain form and also the two chain activated form (where the two chain form is intended it will be so-
10 noted). Exemplary protease domains include at least a sufficient portion of sequences of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 (encoded by nucleotides in SEQ ID No. 5) to exhibit protease activity.

Also contemplated are nucleic acid molecules that encode a polypeptide that has proteolytic activity in an *in vitro* proteolysis assay and that have at least
15 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with the full-length of a protease domain of an MTSP9 polypeptide, or that hybridize along their full-length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full-length to a nucleic acids that encode a protease domain, particularly
20 under conditions of moderate, generally high, stringency.

For the protease domains, residues at the N-terminus can be critical for activity. It is shown herein that the protease domain of the single chain form of the MTSP9 protease is catalytically active. Hence the protease domain generally requires the N-terminal amino acids thereof for activity; the C-terminus portion
25 can be truncated. The amount that can be removed can be determined empirically by testing the polypeptide for protease activity in an *in vitro* assay that assesses catalytic cleavage.

Hence smaller portions of the protease domains, particularly the single chain domains, thereof that retain protease activity are contemplated. Such
30 smaller versions generally are C-terminal truncated versions of the protease domains. The protease domains vary in size and constitution, including insertions and deletions in surface loops. Such domains exhibit conserved

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-24-

structure, including at least one structural feature, such as the active site triad, primary specificity pocket, oxyanion hole and/or other features of serine protease domains of proteases. Thus, for purposes herein, the protease domain is a single chain portion of an MTSP9, as defined herein, but is homologous in its

5 structural features and retention of sequence of similarity or homology the protease domain of chymotrypsin or trypsin. The polypeptide exhibits proteolytic activity as a single chain.

As used herein, by homologous means about greater than 25% nucleic acid sequence identity, such as 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% or 95%. If

10 necessary the percentage homology will be specified. The terms "homology" and "identity" are often used interchangeably. In general, sequences are aligned so that the highest order match is obtained (see, e.g.: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic

15 Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Davereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073).

20 By sequence identity, the number of conserved amino acids are determined by standard alignment algorithms programs, and are used with default gap penalties established by each supplier. Substantially homologous nucleic acid molecules would hybridize typically at moderate stringency or at high stringency all along the length of the nucleic acid or or along at least about 70%, 80% or 90% of

25 the full-length nucleic acid molecule of interest. Also contemplated are nucleic acid molecules that contain degenerate codons in place of codons in the hybridizing nucleic acid molecule.

Whether any two nucleic acid molecules have nucleotide sequences that are at least, for example, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99%

30 "identical" can be determined using known computer algorithms such as the "FAST A" program, using for example, the default parameters as in Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (other programs include the GCG

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-25-

program package (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, *J Molec Biol* 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). For

5 example, the BLAST function of the National Center for Biotechnology Information database can be used to determine identity. Other commercially or publicly available programs include, DNASTar "MegAlign" program (Madison, WI) and the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) "Gap" program (Madison WI). Percent homology or identity of proteins and/or nucleic

10 acid molecules can be determined, for example, by comparing sequence information using a GAP computer program (*e.g.*, Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, as revised by Smith and Waterman ((1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482). Briefly, the GAP program defines similarity as the number of aligned symbols (*i.e.*, nucleotides or amino acids) which are similar, divided by the total

15 number of symbols in the shorter of the two sequences. Default parameters for the GAP program can include: (1) a unary comparison matrix (containing a value of 1 for identities and 0 for non-identities) and the weighted comparison matrix of Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745, as described by Schwartz and Dayhoff, eds., *ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE*, National

20 Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979); (2) a penalty of 3.0 for each gap and an additional 0.10 penalty for each symbol in each gap; and (3) no penalty for end gaps. Therefore, as used herein, the term "identity" represents a comparison between a test and a reference polypeptide or polynucleotide.

As used herein, the term at least "90% identical to" refers to percent

25 identities from 90 to 99.99 relative to the reference polypeptides. Identity at a level of 90% or more is indicative of the fact that, assuming for exemplification purposes a test and reference polynucleotide length of 100 amino acids are compared. No more than 10% (*i.e.*, 10 out of 100) amino acids in the test polypeptide differs from that of the reference polypeptides. Similar comparisons

30 can be made between a test and reference polynucleotides. Such differences can be represented as point mutations randomly distributed over the entire length of an amino acid sequence or they can be clustered in one or more

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-26-

locations of varying length up to the maximum allowable, e.g. 10/100 amino acid difference (approximately 90% identity). Differences are defined as nucleic acid or amino acid substitutions, or deletions. At the level of homologies or identities above about 85-90%, the result should be independent of the program and gap parameters set; such high levels of identity can be assessed readily, often without relying on software.

As used herein, primer refers to an oligonucleotide containing two or more deoxyribonucleotides or ribonucleotides, typically more than three, from which synthesis of a primer extension product can be initiated. Experimental conditions conducive to synthesis include the presence of nucleoside triphosphates and an agent for polymerization and extension, such as DNA polymerase, and a suitable buffer, temperature and pH.

As used herein, animals include any animal, such as, but are not limited to, goats, cows, deer, sheep, rodents, pigs and humans. Non-human animals, exclude humans as the contemplated animal. The SPs provided herein are from any source, animal, plant, prokaryotic and fungal. Most MTSP9s are of animal origin, including mammalian origin.

As used herein, genetic therapy involves the transfer of heterologous nucleic acid, such as DNA, into certain cells, target cells, of a mammal, particularly a human, with a disorder or conditions for which such therapy is sought. The nucleic acid, such as DNA, is introduced into the selected target cells in a manner such that the heterologous nucleic acid, such as DNA, is expressed and a therapeutic product encoded thereby is produced. Alternatively, the heterologous nucleic acid, such as DNA, can in some manner mediate expression of DNA that encodes the therapeutic product, or it can encode a product, such as a peptide or RNA that in some manner mediates, directly or indirectly, expression of a therapeutic product. Genetic therapy can also be used to deliver nucleic acid encoding a gene product that replaces a defective gene or supplements a gene product produced by the mammal or the cell in which it is introduced. The introduced nucleic acid can encode a therapeutic compound, such as a growth factor inhibitor thereof, or a tumor necrosis factor or inhibitor thereof, such as a receptor therefor, that is not

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-27-

normally produced in the mammalian host or that is not produced in therapeutically effective amounts or at a therapeutically useful time. The heterologous nucleic acid, such as DNA, encoding the therapeutic product can be modified prior to introduction into the cells of the afflicted host in order to
5 enhance or otherwise alter the product or expression thereof. Genetic therapy can also involve delivery of an inhibitor or repressor or other modulator of gene expression.

As used herein, heterologous nucleic acid is nucleic acid that (if DNA encodes RNA) and proteins that are not normally produced *in vivo* by the cell in
10 which it is expressed or that mediates or encodes mediators that alter expression of endogenous nucleic acid, such as DNA, by affecting transcription, translation, or other regulatable biochemical processes. Heterologous nucleic acid, such as DNA, can also be referred to as foreign nucleic acid, such as DNA. Any nucleic acid, such as DNA, that one of skill in the art would recognize or consider as
15 heterologous or foreign to the cell in which is expressed is herein encompassed by heterologous nucleic acid; heterologous nucleic acid includes exogenously added nucleic acid that is also expressed endogenously. Examples of heterologous nucleic acid include, but are not limited to, nucleic acid that encodes traceable marker proteins, such as a protein that confers drug
20 resistance, nucleic acid that encodes therapeutically effective substances, such as anti-cancer agents, enzymes and hormones, and nucleic acid, such as DNA, that encodes other types of proteins, such as antibodies. Antibodies that are encoded by heterologous nucleic acid can be secreted or expressed on the surface of the cell in which the heterologous nucleic acid has been introduced.
25 Heterologous nucleic acid is generally not endogenous to the cell into which it is introduced, but has been obtained from another cell or prepared synthetically. Generally, although not necessarily, such nucleic acid encodes RNA and proteins that are not normally produced by the cell in which it is expressed.

As used herein, a therapeutically effective product is a product that is
30 encoded by heterologous nucleic acid, typically DNA, that, upon introduction of the nucleic acid into a host, a product is expressed that ameliorates or eliminates

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-28-

the symptoms, manifestations of an inherited or acquired disease or that cures the disease.

As used herein, recitation that a polypeptide consists essentially of the protease domain means that the only SP portion of the polypeptide is a protease domain or a catalytically active portion thereof. The polypeptide can optionally, and generally will, include additional non-SP-derived sequences of amino acids.

As used herein, cancer or tumor treatment or agent refers to any therapeutic regimen and/or compound that, when used alone or in combination with other treatments or compounds, can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with deficient angiogenesis.

As used herein, domain refers to a portion of a molecule, *e.g.*, proteins or the encoding nucleic acids, that is structurally and/or functionally distinct from other portions of the molecule.

As used herein, protease refers to an enzyme catalyzing hydrolysis of proteins or peptides. It includes the zymogen form and activated forms thereof. For clarity reference to protease refers to all forms, and particular forms will be specifically designated. For purposes herein, the protease domain includes single and two chain forms of the protease domain of an SP protein. For MTSP9 the protease domain also includes single and two chain forms of the protease domain.

As used herein, nucleic acids include DNA, RNA and analogs thereof, including protein nucleic acids (PNA) and mixture thereof. Nucleic acids can be single or double-stranded. When referring to probes or primers, optionally labeled, with a detectable label, such as a fluorescent or radiolabel, single-stranded molecules are contemplated. Such molecules are typically of a length such that their target is statistically unique or of low copy number (typically less than 5, generally less than 3) for probing or priming a library. Generally a probe or primer contains at least 14, 16 or 30 contiguous of sequence complementary to or identical a gene of interest. Probes and primers can be 10, 20, 30, 50, 100 or more nucleic acids long.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-29-

As used herein, nucleic acid encoding a fragment or portion of an SP refers to a nucleic acid encoding only the recited fragment or portion of SP, and not the other contiguous portions of the SP.

As used herein, operative linkage of heterologous nucleic to regulatory and effector sequences of nucleotides, such as promoters, enhancers, transcriptional and translational stop sites, and other signal sequences refers to the relationship between such nucleic acid, such as DNA, and such sequences of nucleotides. For example, operative linkage of heterologous DNA to a promoter refers to the physical relationship between the DNA and the promoter such that the transcription of such DNA is initiated from the promoter by an RNA polymerase that specifically recognizes, binds to and transcribes the DNA in reading frame. Thus, operatively linked or operationally associated refers to the functional relationship of nucleic acid, such as DNA, with regulatory and effector sequences of nucleotides, such as promoters, enhancers, transcriptional and translational stop sites, and other signal sequences. For example, operative linkage of DNA to a promoter refers to the physical and functional relationship between the DNA and the promoter such that the transcription of such DNA is initiated from the promoter by an RNA polymerase that specifically recognizes, binds to and transcribes the DNA. In order to optimize expression and/or *in vitro* transcription, it can be necessary to remove, add or alter 5' untranslated portions of the clones to eliminate extra, potential inappropriate alternative translation initiation (*i.e.*, start) codons or other sequences that can interfere with or reduce expression, either at the level of transcription or translation. Alternatively, consensus ribosome binding sites (see, *e.g.*, Kozak *J. Biol. Chem.* 266:19867-19870 (1991)) can be inserted immediately 5' of the start codon and can enhance expression. The desirability of (or need for) such modification can be empirically determined.

As used herein, a sequence complementary to at least a portion of an RNA, with reference to antisense oligonucleotides, means a sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize with the RNA, generally under moderate or high stringency conditions, forming a stable duplex; in the case of double-stranded SP antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-30-

(or dsRNA) can thus be tested, or triplex formation can be assayed. The ability to hybridize depends on the degree of complementarity and the length of the antisense nucleic acid. Generally, the longer the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with a SP encoding RNA it can contain and still form a stable duplex (or triplex, as the case can be). One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

For purposes herein, amino acid substitutions can be made in any of SPs and protease domains thereof provided that the resulting protein exhibits protease activity. Amino acid substitutions contemplated include conservative substitutions, such as those set forth in Table 1, which do not eliminate proteolytic activity. As described herein, substitutions that alter properties of the proteins, such as removal of cleavage sites and other such sites are also contemplated; such substitutions are generally non-conservative, but can be readily effected by those of skill in the art.

Suitable conservative substitutions of amino acids are known to those of skill in this art and can be made generally without altering the biological activity, for example enzymatic activity, of the resulting molecule. Those of skill in this art recognize that, in general, single amino acid substitutions in non-essential regions of a polypeptide do not substantially alter biological activity (see, *e.g.*, Watson *et al. Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224). Also included within the definition, is the catalytically active fragment of an SP, particularly a single chain protease portion. Conservative amino acid substitutions are made, for example, in accordance with those set forth in TABLE 1 as follows:

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-31-

TABLE 1

	Original residue	Conservative substitution
	Ala (A)	Gly; Ser; Abu
	Arg (R)	Lys, orn
5	Asn (N)	Gln; His
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
	Gly (G)	Ala; Pro
10	His (H)	Asn; Gln
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Nle; Nva
	Leu (L)	Ile; Val; Met; Nle; Nv
	Lys (K)	Arg; Gln; Glu
	Met (M)	Leu; Tyr; Ile; NLe Val
15	Ornithine	Lys; Arg
	Phe (F)	Met; Leu; Tyr
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
20	Tyr (Y)	Trp; Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Nle; Nv

Other substitutions are also permissible and can be determined empirically or in accord with known conservative substitutions.

As used herein, Abu is 2-aminobutyric acid; Orn is ornithine.

25 As used herein, the amino acids, which occur in the various amino acid sequences appearing herein, are identified according to their well-known, three-letter or one-letter abbreviations. The nucleotides, which occur in the various DNA fragments, are designated with the standard single-letter designations used routinely in the art.

30 As used herein, a probe or primer based on a nucleotide sequence disclosed herein, includes at least 10, 14, typically at least 16 contiguous sequence of nucleotides of SEQ ID No. 5, and probes of at least 30, 50 or 100 contiguous sequence of nucleotides of SEQ ID No. 5. The length of the probe or primer for unique hybridization is a function of the complexity of the genome of interest.

35 As used herein, amelioration of the symptoms of a particular disorder by administration of a particular pharmaceutical composition refers to any lessening, whether permanent or temporary, lasting or transient that can be attributed to or associated with administration of the composition.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-32-

As used herein, antisense polynucleotides refer to synthetic sequences of nucleotide bases complementary to mRNA or the sense strand of double-stranded DNA. Admixture of sense and antisense polynucleotides under appropriate conditions leads to the binding of the two molecules, or

5 hybridization. When these polynucleotides bind to (hybridize with) mRNA, inhibition of protein synthesis (translation) occurs. When these polynucleotides bind to double-stranded DNA, inhibition of RNA synthesis (transcription) occurs. The resulting inhibition of translation and/or transcription leads to an inhibition of the synthesis of the protein encoded by the sense strand. Antisense nucleic

10 acid molecule typically contain a sufficient number of nucleotides to specifically bind to a target nucleic acid, generally at least 5 contiguous nucleotides, often at least 14 or 16 or 30 contiguous nucleotides or modified nucleotides complementary to the coding portion of a nucleic acid molecule that encodes a gene of interest, for example, nucleic acid encoding a single chain protease

15 domain of an SP.

As used herein, an array refers to a collection of elements, such as antibodies, containing three or more members. An addressable array is one in which the members of the array are identifiable, typically by position on a solid phase support. Hence, in general the members of the array are immobilized on

20 discrete identifiable loci on the surface of a solid phase.

As used herein, antibody refers to an immunoglobulin, whether natural or partially or wholly synthetically produced, including any derivative thereof that retains the specific binding ability the antibody. Hence antibody includes any protein having a binding domain that is homologous or substantially homologous

25 to an immunoglobulin binding domain. Antibodies include members of any immunoglobulin claims, including IgG, IgM, IgA, IgD and IgE.

As used herein, antibody fragment refers to any derivative of an antibody that is less than full-length, retaining at least a portion of the full-length antibody's specific binding ability. Examples of antibody fragments include, but

30 are not limited to, Fab, Fab', F(ab)₂, single-chain Fvs (scFV), FV, dsFV diabody and Fd fragments. The fragment can include multiple chains linked together,

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-33-

such as by disulfide bridges. An antibody fragment generally contains at least about 50 amino acids and typically at least 200 amino acids.

As used herein, an Fv antibody fragment is composed of one variable heavy domain (V_H) and one variable light domain linked by noncovalent interactions.

As used herein, a dsFV refers to an Fv with an engineered intermolecular disulfide bond, which stabilizes the V_H - V_L pair.

As used herein, an $F(ab)_2$ fragment is an antibody fragment that results from digestion of an immunoglobulin with pepsin at pH 4.0-4.5; it can be recombinantly expressed to produce the equivalent fragment.

As used herein, Fab fragments are antibody fragments that result from digestion of an immunoglobulin with papain; they can be recombinantly expressed to produce the equivalent fragment.

As used herein, scFVs refer to antibody fragments that contain a variable light chain (V_L) and variable heavy chain (V_H) covalently connected by a polypeptide linker in any order. The linker is of a length such that the two variable domains are bridged without substantial interference. Included linkers are $(Gly-Ser)_n$ residues with some Glu or Lys residues dispersed throughout to increase solubility.

As used herein, humanized antibodies refer to antibodies that are modified to include human sequences of amino acids so that administration to a human does not provoke an immune response. Methods for preparation of such antibodies are known. For example, to produce such antibodies, the hybridoma or other prokaryotic or eukaryotic cell, such as an *E. coli* or a CHO cell, that expresses the monoclonal antibody are altered by recombinant DNA techniques to express an antibody in which the amino acid composition of the non-variable region is based on human antibodies. Computer programs have been designed to identify such regions.

As used herein, diabodies are dimeric scFV; diabodies typically have shorter peptide linkers than scFVs, and they generally dimerize.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-34-

As used herein, production by recombinant means by using recombinant DNA methods means the use of the well known methods of molecular biology for expressing proteins encoded by cloned DNA.

As used herein the term assessing is intended to include

- 5 quantitative and qualitative determination in the sense of obtaining an absolute value for the activity of an SP, or a domain thereof, present in the sample, and also of obtaining an index, ratio, percentage, visual or other value indicative of the level of the activity. Assessment can be direct or indirect and the chemical species actually detected need not of course be the proteolysis
10 product itself but can for example be a derivative thereof or some further substance.

- As used herein, biological activity refers to the *in vivo* activities of a compound or physiological responses that result upon *in vivo* administration of a compound, composition or other mixture. Biological activity, thus, encompasses
15 therapeutic effects and pharmaceutical activity of such compounds, compositions and mixtures. Biological activities can be observed in *in vitro* systems designed to test or use such activities. Thus, for purposes herein the biological activity of a luciferase is its oxygenase activity whereby, upon oxidation of a substrate, light is produced.

- 20 As used herein, functional activity refers to a polypeptide or portion thereof that displays one or more activities associated with a full-length protein. Functional activities include, but are not limited to, biological activity, catalytic or enzymatic activity, antigenicity (ability to bind to or compete with a polypeptide for binding to an anti-polypeptide antibody), immunogenicity, ability to form
25 multimers, the ability to specifically bind to a receptor or ligand for the polypeptide.

- As used herein, a conjugate refers to the compounds provided herein that include one or more SPs, including an MTSP9, particularly single chain protease domains thereof, and one or more targeting agents. These conjugates include
30 those produced by recombinant means as fusion proteins, those produced by chemical means, such as by chemical coupling, through, for example, coupling to sulfhydryl groups, and those produced by any other method whereby at least

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-35-

one SP, or a domain thereof, is linked, directly or indirectly via linker(s) to a targeting agent.

As used herein, a targeting agent is any moiety, such as a protein or effective portion thereof, that provides specific binding of the conjugate to a cell surface receptor, which, can internalize the conjugate or SP portion thereof. A targeting agent can also be one that promotes or facilitates, for example, affinity isolation or purification of the conjugate; attachment of the conjugate to a surface; or detection of the conjugate or complexes containing the conjugate.

As used herein, an antibody conjugate refers to a conjugate in which the targeting agent is an antibody.

As used herein, derivative or analog of a molecule refers to a portion derived from or a modified version of the molecule.

As used herein, an effective amount of a compound for treating a particular disease is an amount that is sufficient to ameliorate, or in some manner reduce the symptoms associated with the disease. Such amount can be administered as a single dosage or can be administered according to a regimen, whereby it is effective. The amount can cure the disease but, typically, is administered in order to ameliorate the symptoms of the disease. Repeated administration can be required to achieve the desired amelioration of symptoms.

As used herein equivalent, when referring to two sequences of nucleic acids means that the two sequences in question encode the same sequence of amino acids or equivalent proteins. When equivalent is used in referring to two proteins or peptides, it means that the two proteins or peptides have substantially the same amino acid sequence with only amino acid substitutions (such, as but not limited to, conservative changes such as those set forth in Table 1, above) that do not substantially alter the activity or function of the protein or peptide. When equivalent refers to a property, the property does not need to be present to the same extent (*e.g.*, two peptides can exhibit different rates of the same type of enzymatic activity), but the activities are usually substantially the same. Complementary, when referring to two nucleotide sequences, means that the two sequences of nucleotides are capable of hybridizing, typically with less than 25%, 15%, 5% or 0% mismatches between

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-36-

opposed nucleotides. If necessary the percentage of complementarity will be specified. Typically the two molecules are selected such that they will hybridize under conditions of high stringency.

As used herein, an agent that modulates the activity of a protein or
5 expression of a gene or nucleic acid either decreases or increases or otherwise alters the activity of the protein or, in some manner up- or down-regulates or otherwise alters expression of the nucleic acid in a cell.

As used herein, inhibitor of the activity of an SP encompasses any substance that prohibits or decrease production, post-translational
10 modification(s), maturation, or membrane localization of the SP or any substance that interferes with or decreases the proteolytic efficacy of thereof, particularly of a single chain form in an *in vitro* screening assay.

As used herein, a method for treating or preventing neoplastic disease means that any of the symptoms, such as the tumor, metastasis thereof, the
15 vascularization of the tumors or other parameters by which the disease is characterized are reduced, ameliorated, prevented, placed in a state of remission, or maintained in a state of remission. It also means that the hallmarks of neoplastic disease and metastasis can be eliminated, reduced or prevented by the treatment. Non-limiting examples of the hallmarks include uncontrolled
20 degradation of the basement membrane and proximal extracellular matrix, migration, division, and organization of the endothelial cells into new functioning capillaries, and the persistence of such functioning capillaries.

As used herein, pharmaceutically acceptable salts, esters or other derivatives of the conjugates include any salts, esters or derivatives that can be
25 readily prepared by those of skill in this art using known methods for such derivatization and that produce compounds that can be administered to animals or humans without substantial toxic effects and that either are pharmaceutically active or are prodrugs.

As used herein, a prodrug is a compound that, upon *in vivo*
30 administration, is metabolized or otherwise converted to the biologically, pharmaceutically or therapeutically active form of the compound. To produce a prodrug, the pharmaceutically active compound is modified such that the active

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-37-

compound is regenerated by metabolic processes. The prodrug can be designed to alter the metabolic stability or the transport characteristics of a drug, to mask side effects or toxicity, to improve the flavor of a drug or to alter other characteristics or properties of a drug. By virtue of knowledge of pharmacodynamic processes and drug metabolism *in vivo*, those of skill in this art, once a pharmaceutically active compound is known, can design prodrugs of the compound (see, e.g., Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

As used herein, a drug identified by the screening methods provided herein refers to any compound that is a candidate for use as a therapeutic or as a lead compound for the design of a therapeutic. Such compounds can be small molecules, including small organic molecules, peptides, peptide mimetics, antisense molecules or dsRNA, such as RNAi, antibodies, fragments of antibodies, recombinant antibodies and other such compounds that can serve as drug candidates or lead compounds.

As used herein, a peptidomimetic is a compound that mimics the conformation and certain stereochemical features of the biologically active form of a particular peptide. In general, peptidomimetics are designed to mimic certain desirable properties of a compound, but not the undesirable properties, such as flexibility, that lead to a loss of a biologically active conformation and bond breakdown. Peptidomimetics may be prepared from biologically active compounds by replacing certain groups or bonds that contribute to the undesirable properties with bioisosteres. Bioisosteres are known to those of skill in the art. For example the methylene bioisostere CH_2S has been used as an amide replacement in enkephalin analogs (see, e.g., Spatola (1983) pp. 267-357 in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Weistein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York). Morphine, which can be administered orally, is a compound that is a peptidomimetic of the peptide endorphin. For purposes herein, cyclic peptides are included among peptidomimetics.

As used herein, a promoter region or promoter element refers to a segment of DNA or RNA that controls transcription of the DNA or RNA to which it is operatively linked. The promoter region includes specific sequences that are

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-38-

sufficient for RNA polymerase recognition, binding and transcription initiation. This portion of the promoter region is referred to as the promoter. In addition, the promoter region includes sequences that modulate this recognition, binding and transcription initiation activity of RNA polymerase. These sequences can be *cis* acting or can be responsive to *trans* acting factors. Promoters, depending upon the nature of the regulation, can be constitutive or regulated. Exemplary promoters contemplated for use in prokaryotes include the bacteriophage T7 and T3 promoters.

As used herein, a receptor refers to a molecule that has an affinity for a given ligand. Receptors can be naturally-occurring or synthetic molecules. Receptors can also be referred to in the art as anti-ligands. As used herein, the receptor and anti-ligand are interchangeable. Receptors can be used in their unaltered state or as aggregates with other species. Receptors can be attached, covalently or noncovalently, or in physical contact with, to a binding member, either directly or indirectly via a specific binding substance or linker. Examples of receptors, include, but are not limited to: antibodies, cell membrane receptors surface receptors and internalizing receptors, monoclonal antibodies and antisera reactive with specific antigenic determinants [such as on viruses, cells, or other materials], drugs, polynucleotides, nucleic acids, peptides, cofactors, lectins, sugars, polysaccharides, cells, cellular membranes, and organelles.

Examples of receptors and applications using such receptors, include but are not restricted to:

- a) enzymes: specific transport proteins or enzymes essential to survival of microorganisms, which could serve as targets for antibiotic [ligand] selection;
- b) antibodies: identification of a ligand-binding site on the antibody molecule that combines with the epitope of an antigen of interest can be investigated; determination of a sequence that mimics an antigenic epitope can lead to the development of vaccines of which the immunogen is based on one or more of such sequences or lead to the development of related diagnostic agents or compounds useful in therapeutic treatments such as for auto-immune diseases
- c) nucleic acids: identification of ligand, such as protein or RNA, binding sites;

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-39-

d) catalytic polypeptides: polymers, including polypeptides, that are capable of promoting a chemical reaction involving the conversion of one or more reactants to one or more products; such polypeptides generally include a binding site specific for at least one reactant or reaction intermediate and an active functionality proximate to the binding site, in which the functionality is capable of chemically modifying the bound reactant (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,215,899);

e) hormone receptors: determination of the ligands that bind with high affinity to a receptor is useful in the development of hormone replacement therapies; for example, identification of ligands that bind to such receptors can lead to the development of drugs to control blood pressure; and

f) opiate receptors: determination of ligands that bind to the opiate receptors in the brain is useful in the development of less-addictive replacements for morphine and related drugs.

As used herein, sample refers to anything which can contain an analyte for which an analyte assay is desired. The sample can be a biological sample, such as a biological fluid or a biological tissue. Examples of biological fluids include urine, blood, plasma, serum, saliva, semen, stool, sputum, cerebral spinal fluid, tears, mucus, sperm, amniotic fluid or the like. Biological tissues are aggregate of cells, usually of a particular kind together with their intercellular substance that form one of the structural materials of a human, animal, plant, bacterial, fungal or viral structure, including connective, epithelium, muscle and nerve tissues. Examples of biological tissues also include organs, tumors, lymph nodes, arteries and individual cell(s).

As used herein: stringency of hybridization in determining percentage mismatch is as follows:

- 1) high stringency: 0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65°C
- 2) medium stringency: 0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C
- 3) low stringency: 1.0 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C

Those of skill in this art know that the washing step selects for stable hybrids and also know the ingredients of SSPE (see, *e.g.*, Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, in: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-40-

Harbor Laboratory Press (1989), vol. 3, p. B.13, see, also, numerous catalogs that describe commonly used laboratory solutions). SSPE is pH 7.4 phosphate-buffered 0.18 NaCl. Further, those of skill in the art recognize that the stability of hybrids is determined by T_m , which is a function of the sodium ion concentration and temperature ($T_m = 81.5^\circ \text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G} + \text{C}) - 600/l$), so that the only parameters in the wash conditions critical to hybrid stability are sodium ion concentration in the SSPE (or SSC) and temperature.

It is understood that equivalent stringencies can be achieved using alternative buffers, salts and temperatures. By way of example and not limitation, procedures using conditions of low stringency are as follows (see also Shilo and Weinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6789-6792 (1981)): Filters containing DNA are pretreated for 6 hours at 40°C in a solution containing 35% formamide, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.1% PVP, 0.1% Ficoll, 1% BSA, and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA (10X SSC is 1.5 M sodium chloride, and 0.15 M sodium citrate, adjusted to a pH of 7).

Hybridizations are carried out in the same solution with the following modifications: 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA, 10% (wt/vol) dextran sulfate, and $5\text{-}20 \times 10^6$ cpm ^{32}P -labeled probe is used. Filters are incubated in hybridization mixture for 18-20 hours at 40°C , and then washed for 1.5 hours at 55°C in a solution containing 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.1% SDS. The wash solution is replaced with fresh solution and incubated an additional 1.5 hours at 60°C . Filters are blotted dry and exposed for autoradiography. If necessary, filters are washed for a third time at $65\text{-}68^\circ \text{C}$ and reexposed to film. Other conditions of low stringency which can be used are well known in the art (e.g., as employed for cross-species hybridizations).

By way of example and not way of limitation, procedures using conditions of moderate stringency include, for example, but are not limited to, procedures using such conditions of moderate stringency are as follows: Filters containing DNA are pretreated for 6 hours at 55°C in a solution containing 6X SSC, 5X Denhart's solution, 0.5% SDS and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA. Hybridizations are carried out in the same solution and $5\text{-}20 \times 10^6$ cpm

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-41-

³²P-labeled probe is used. Filters are incubated in hybridization mixture for 18-20 hours at 55°C, and then washed twice for 30 minutes at 60°C in a solution containing 1X SSC and 0.1% SDS. Filters are blotted dry and exposed for autoradiography. Other conditions of moderate stringency which can be used are well-known in the art. Washing of filters is done at 37°C for 1 hour in a solution containing 2X SSC, 0.1% SDS.

By way of example and not way of limitation, procedures using conditions of high stringency are as follows: Prehybridization of filters containing DNA is carried out for 8 hours to overnight at 65°C in buffer composed of 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, and 500 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Filters are hybridized for 48 hours at 65°C in prehybridization mixture containing 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA and 5-20 X 10⁵ cpm of ³²P-labeled probe. Washing of filters is done at 37°C for 1 hour in a solution containing 2X SSC, 0.01% PVP, 0.01% Ficoll, and 0.01% BSA. This is followed by a wash in 0.1X SSC at 50°C for 45 minutes before autoradiography. Other conditions of high stringency which can be used are well known in the art.

The term substantially identical or substantially homologous or similar varies with the context as understood by those skilled in the relevant art and generally means at least 60% or 70%, preferably means at least 80%, 85% or more preferably at least 90%, and most preferably at least 95% identity.

As used herein, substantially identical to a product means sufficiently similar so that the property of interest is sufficiently unchanged so that the substantially identical product can be used in place of the product.

As used herein, substantially pure means sufficiently homogeneous to appear free of readily detectable impurities as determined by standard methods of analysis, such as thin layer chromatography (TLC), gel electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC), used by those of skill in the art to assess such purity, or sufficiently pure such that further purification would not detectably alter the physical and chemical properties, such as enzymatic and biological activities, of the substance. Methods for purification of the compounds to produce substantially chemically pure compounds are known to

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-42-

those of skill in the art. A substantially chemically pure compound can, however, be a mixture of stereoisomers or isomers. In such instances, further purification might increase the specific activity of the compound.

As used herein, target cell refers to a cell that expresses an SP *in vivo*.

5 As used herein, test substance (or test compound) refers to a chemically defined compound (*e.g.*, organic molecules, inorganic molecules, organic/inorganic molecules, proteins, peptides, nucleic acids, oligonucleotides, lipids, polysaccharides, saccharides, or hybrids among these molecules such as glycoproteins, etc.) or mixtures of compounds (*e.g.*, a library of test compounds, 10 natural extracts or culture supernatants, etc.) whose effect on an SP, particularly a single chain form that includes the protease domain or a sufficient portion thereof for activity, as determined by an *in vitro* method, such as the assays provided herein.

As used herein, the terms a therapeutic agent, therapeutic regimen, 15 radioprotectant or chemotherapeutic mean conventional drugs and drug therapies, including vaccines, which are known to those skilled in the art. Radiotherapeutic agents are well known in the art.

As used herein, treatment means any manner in which the symptoms of a condition, disorder or disease are ameliorated or otherwise beneficially altered.

20 Treatment also encompasses any pharmaceutical use of the compositions herein.

As used herein, vector (or plasmid) refers to discrete elements that are used to introduce heterologous nucleic acid into cells for either expression or replication thereof. The vectors typically remain episomal, but can be designed to effect integration of a gene or portion thereof into a chromosome of the 25 genome. Also contemplated are vectors that are artificial chromosomes, such as yeast artificial chromosomes and mammalian artificial chromosomes. Selection and use of such vehicles are well known to those of skill in the art. An expression vector includes vectors capable of expressing DNA that is operatively linked with regulatory sequences, such as promoter regions, that are capable of 30 effecting expression of such DNA fragments. Thus, an expression vector refers to a recombinant DNA or RNA construct, such as a plasmid, a phage, recombinant virus or other vector that, upon introduction into an appropriate

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-43-

host cell, results in expression of the cloned DNA. Appropriate expression vectors are well known to those of skill in the art and include those that are replicable in eukaryotic cells and/or prokaryotic cells and those that remain episomal or those which integrate into the host cell genome.

5 As used herein, protein binding sequence refers to a protein or peptide sequence that is capable of specific binding to other protein or peptide sequences generally, to a set of protein or peptide sequences or to a particular protein or peptide sequence.

10 As used herein, epitope tag refers to a short stretch of amino acid residues corresponding to an epitope to facilitate subsequent biochemical and immunological analysis of the epitope tagged protein or peptide. Epitope tagging is achieved by including the sequence of the epitope tag to the protein-encoding sequence in an appropriate expression vector. Epitope tagged proteins can be affinity purified using highly specific antibodies raised against the tags.

15 As used herein, metal binding sequence refers to a protein or peptide sequence that is capable of specific binding to metal ions generally, to a set of metal ions or to a particular metal ion.

 As used herein, a combination refers to any association between two or among more items.

20 As used herein, a composition refers to a any mixture. It can be a solution, a suspension, liquid, powder, a paste, aqueous, non-aqueous or any combination thereof.

 As used herein, fluid refers to any composition that can flow. Fluids thus encompass compositions that are in the form of semi-solids, pastes, solutions, 25 aqueous mixtures, gels, lotions, creams and other such compositions.

 As used herein, a cellular extract refers to a preparation or fraction which is made from a lysed or disrupted cell.

 As used herein, an agent is said to be randomly selected when the agent is chosen randomly without considering the specific sequences involved in the 30 association of a protein alone or with its associated substrates, binding partners, etc. An example of randomly selected agents is the use a chemical library or a

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-44-

peptide combinatorial library, or a growth broth of an organism or conditioned medium.

As used herein, an agent is said to be rationally selected or designed when the agent is chosen on a non-random basis which takes into account the sequence of the target site and/or its conformation in connection with the agent's action. As described in the Examples, there are proposed binding sites for serine protease and (catalytic) sites in the protein having SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4. Agents can be rationally selected or rationally designed by utilizing the peptide sequences that make up these sites. For example, a rationally selected peptide agent can be a peptide whose amino acid sequence is identical to the ATP or calmodulin binding sites or domains.

For clarity of disclosure, and not by way of limitation, the detailed description is divided into the subsections that follow.

B. MTSP9 polypeptides, muteins, derivatives and analogs thereof

MTSPs

The MTSPs are a family of transmembrane serine proteases that are found in mammals and also other species. MTSPs are of interest because they appear to be expressed and/or activated at different levels in tumor cells from normal cells, or have functional activity that is different in tumor cells from normal cells, such as by an alteration in a substrate therefor, or a cofactor or a receptor.

The MTSPs share a number of common structural features including: a proteolytic extracellular C-terminal domain; a transmembrane domain, with a hydrophobic domain near the N-terminus; a short cytoplasmic domain; and a variable length stem region that may contain additional modular domains. The proteolytic domains share sequence homology including conserved His, Asp, and Ser residues necessary for catalytic activity that are present in conserved motifs. The MTSPs are normally synthesized as zymogens and can be activated to two-chain forms by cleavage. It is shown herein that the single chain proteolytic domain can function *in vitro* and, hence is useful in *in vitro* assays for identifying agents that modulate the activity of members of this family.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-45-

For purposes herein, the protease domain of the MTSP does not have to result from activation cleavage, which produces a two chain activated product, but rather includes single chain polypeptides where the N-terminii include the consensus sequence ↓VVG↓, ↓IVGG, ↓VGLL, ↓ILGG, ↓IVQG or ↓IVNG ↓IASG
 5 or other such motif. Such polypeptides, although not the result of activation cleavage and not two-chain forms, exhibit proteolytic (catalytic) activity. These protease domain polypeptides are used in assays to screen for agents that modulate the activity of the MTSP9.

The MTSP family is a target for therapeutic intervention and also some
 10 members can serve as diagnostic markers for tumor development, growth and/or progression. As discussed, the members of this family are involved in proteolytic processes that are implicated in tumor development, growth and/or progression. This implication is based upon their functions as proteolytic enzymes in processes related to ECM degradation and/or remodeling and
 15 activation of pro-growth factors, pro-hormones or pro-angiogenic compounds. In addition, their levels of expression or level of activation or their apparent activity resulting from substrate levels or alterations in substrates and levels thereof differs in tumor cells and non-tumor cells in the same tissue. Similarly the level of co-factors or receptors for these proteases can vary between tumor and non-
 20 tumor cells. Hence, protocols and treatments that alter their activity, such as their proteolytic activities and roles in signal transduction, and/or their expression, such as by contacting them with a compound that modulates their activity and/or expression, could impact tumor development, growth and/or progression. Also, in some instances, the level of activation and/or expression
 25 can be altered in tumors, such as lung carcinoma, colon adenocarcinoma and ovarian carcinoma.

MTSP9

MTSP9 is of interest because it is expressed or is active in tumor cells. The MTSP provided herein can serve as a diagnostic marker for particular
 30 tumors, by virtue of a level of activity and/or expression or function in a subject (i.e. a mammal, particularly a human) with neoplastic disease, compared to a subject or subjects that do not have the neoplastic disease. In addition,

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-46-

detection of activity (and/or expression) in a particular tissue can be indicative of neoplastic disease.

It is shown herein, that MTSP9s provided herein are expressed and/or activated in certain tumors; hence their activation or expression can serve as a diagnostic marker for tumor development, growth and/or progression. In other instances, the MTSP polypeptide can exhibit altered activity by virtue of a change in activity or expression of a co-factor, a substrate or a receptor. In addition, in some instances, these MTSPs and/or variants thereof can be shed from cell surfaces. Detection of the shed MTSPs, particularly the extracellular protease domains, in body fluids, such as serum, blood, saliva, cerebral spinal fluid, synovial fluid and interstitial fluids, urine, sweat and other such fluids and secretions, can serve as a diagnostic tumor marker. In particular, detection of higher levels of such shed polypeptides in a subject compared to a subject known not to have any neoplastic disease or compared to earlier samples from the same subject, can be indicative of neoplastic disease in the subject.

Polypeptides and muteins

Provided herein are isolated substantially pure single chain and two chain polypeptides that contain the protease domain of an MTSP9. The polypeptides also can include other non-MTSP sequences of amino acids, but includes the protease domain or a sufficient portion thereof to exhibit catalytic activity in any *in vitro* assay that assess such protease activity, such as any provided herein.

MTSP9 polypeptides provided herein are expressed or activated by or in tumor cells, typically at a level that differs from the level in which they are expressed by or activated in a non-tumor cell of the same type. Hence, for example, if the MTSP is expressed in an cervical tumor cell, it is expressed or active at a different level from in non-tumor cervical cells. MTSP9 expression or activation can be indicative of cervical, lung, esophageal, colon, prostate, uterine, pancreatic, breast and other tumors.

Isolated, substantially pure proteases that include protease domains or a catalytically active portion thereof are provided. Provided are single chain forms and two chain forms of the MTSP9. The protease domains can be included in a longer protein, and such longer protein is optionally the MTSP9 zymogen.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-47-

Exemplary MTSP9-encoding nucleic acid and protein sequences of a protease domain are set forth in SEQ ID Nos. 5 and 6, and a full-length protein and encoding nucleic acid sequence is set forth in SEQ ID Nos. 18 and 17. Thus, an MTSP9 polypeptide includes the sequence of amino acids set forth in SEQ ID Nos. 6, 16 or 18. Smaller portions thereof that retain protease activity are contemplated. The protease domain thereof is set forth in SEQ ID No. 16.

Substantially purified MTSP9 protease is encoded by a nucleic acid that hybridizes to a nucleic acid molecule containing the protease domain encoded by the nucleotide sequence set forth in any of SEQ. ID Nos. 5 and 17 under at least moderate, generally high, stringency conditions, such that the protease domain encoding nucleic acid thereof hybridizes along its full-length or at least 70%, 80% or 90% of the full-length. In certain embodiments the substantially purified MTSP protease is a single chain polypeptide that includes substantially the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6, 18 or the protease domain portion thereof, or a catalytically active portion thereof.

Also included are substantially purified MTSP9 zymogens, activated two chain forms, single chain protease domains and two chain protease domains. These polypeptides are encoded by a nucleic acid that includes sequence encoding a protease domain that exhibits proteolytic activity and that hybridizes to a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. 5 or 7, typically under moderate, generally under high stringency, conditions and generally along the full-length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full-length (or substantially the full-length) of the protease domain. Splice variants are also contemplated herein.

25 Protease domains

MTSP protease domains include the single chain protease domains of MTSP9. Provided are the protease domains or proteins that include a portion of an MTSP that is the protease domain of any MTSP, particularly a MTSP9. The protein can also include other non-MTSP sequences of amino acids, but includes the protease domain or a sufficient portion thereof to exhibit catalytic activity in any *in vitro* assay that assess such protease activity, such as any provided

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-48-

herein. Also provided are two chain activated forms of the full length protease and also two chain forms of the protease domain.

Thus, isolated, substantially pure proteases that include the protease domains or catalytically active portions thereof as single chain forms of SPs are provided. The protease domains can be included in a longer protein, and such longer protein is optionally the MTSP9 zymogen

In particular, exemplary protease domains include at least a sufficient portion of sequences of amino acids set forth as amino acids 206-438 in SEQ ID No. 16 (encoded by nucleotides in SEQ ID No. 15 and 17.

As noted, the protease domains of an MTSP are single-chain polypeptides or two-chain polypeptides, with an N-terminus (such as IV, VV, IL and II) generated at the cleavage site (generally having the consensus sequence R↓VVG, R↓IVG, R↓IVO, R↓IVNG, R↓ILG, R↓VGL, R↓ILG or a variation thereof; an N-terminus R↓V or R↓I, where the arrow represents the cleavage point) when the zymogen is activated. The protease domain of an exemplary MTSP9, produced is produced by activation cleavage between R₁₈₅ and I₁₈₆ (R↓I) includes the sequence R↓IASG, as set forth in SEQ ID Nos. 17 and 18.

Muteins and derivatives

Full-length MTSP9, zymogen and activated forms thereof and MTSP9 protease domains, portions thereof, and muteins and derivatives of such polypeptides are provided. The domains, fragments, derivatives or analogs of an MTSP9 that are functionally active are capable of exhibiting one or more functional activities associated with the MTSP9 polypeptide, such as serine protease activity, immunogenicity and antigenicity, are provided.

Among the derivatives are those based on animal MTSP9s, including, but are not limited to, rodent, such as mouse and rat; fowl, such as chicken; ruminants, such as goats, cows, deer, sheep; ovine, such as pigs; and humans. For example, MTSP9 derivatives can be made by altering their sequences by substitutions, additions or deletions. MTSP9 derivatives include, but are not limited to, those containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of MTSP9, including altered sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-49-

the sequence resulting in a silent change. For example, one or more amino acid residues within the sequence can be substituted by another amino acid of a similar polarity which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence can be selected

5 from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine,

10 lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid (see, *e.g.*, Table 1). Muteins of the MTSP9 or a domain thereof, such as a protease domain, in which up to about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% or 95% of the amino acids are replaced with another amino acid are provided. Generally such muteins retain at

15 least about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% or 90% of the protease activity the unmutated protein.

Muteins of the MTSP9 or a domain thereof, such as a protease domain, in which up to about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

20 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the amino acids are replaced with another amino acid are provided. Generally such muteins retain at least about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% or 90% of the protease activity the unmutated protein.

Included among the polypeptides provided herein are the MTSP9 protease

25 domain or a polypeptide with amino acid changes such that the specificity and protease activity remains substantially unchanged or changed (increased or decreased) by a specified percentage, such as 10, 20, 30, 40, 50%. In particular, a substantially purified mammalian MTSP polypeptide is provided that has a transmembrane domain and can additionally include a transmembrane (TM)

30 domain, a SEA domain and a serine protease catalytic domain is provided.

Also provided is a substantially purified protein containing a sequence of amino acids that has at least 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-50-

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to the MTSP9 where the percentage identity is determined using standard algorithms and gap penalties that maximize the percentage

identity. The human MTSP9 polypeptide is included, although other mammalian

5 MTSP9 polypeptides are contemplated. The precise percentage of identity can be specified if needed.

Mutins in which one or more of the Cys residues, particularly, a residue that is paired in the activated two form, but unpaired in the protease domain alone is/are replaced with any amino acid, typically, although not necessarily, a

10 conservative amino acid residue, such as Ser, are contemplated. Disulfide bonds

pairing in MTSP9 is as follows: C₁₇₅-C₂₉₂, C₂₁₂-C₂₂₈, C₃₃₇-C₃₅₃, C₃₆₄-C₃₈₃. The Cys₂₉₂ is in the protease domain and is unpaired in the single chain form of the

protease domain. Mutins of MTSP9, particularly those in which Cys residues,

15 such as the Cys₂₉₂ in the single chain protease domain, is replaced with another amino acid, such as Ser, Gly or Ala, that does not eliminate the activity, are

provided. Also provided are substantially purified MTSP9 polypeptides and functional domains thereof, including catalytically active domains and portions, that have at least about 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,

20 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with a protease domain that includes the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 16 or a catalytically active portion thereof or with a protease that includes the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 18 and domains thereof.

Mutins of the protein are also provided in which amino acids are

25 replaced with other amino acids. Among the mutins are those in which the Cys residues, is/are replaced typically with a conservative amino acid residues, such as a serine. Such mutins are also provided herein. Mutins in which 10%,

20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% or more of the amino acids are replaced but the resulting polypeptide retains at least about 10%, 20%, 30%, 35%, 40%,

30 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 95% of the catalytic activity as the unmodified form for the same substrate.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-51-

Mutants can be made by making conservative amino acid substitutions and also non-conservative amino acid substitutions. For example, amino acid substitutions the desirably alter properties of the proteins can be made. In one embodiment, mutations that prevent degradation of the polypeptide can be made. Many proteases cleave after basic residues, such as R and K; to eliminate such cleavage, the basic residue is replaced with a non-basic residue. Also, non-conservative changes at amino acids outside of the protease domain can be effected without altering protease activity. Non-conservative changes at amino acids that are responsible for activities other than protease activity may be desirable. For example, interaction of the protease with an inhibitor can be blocked while retaining catalytic activity by effecting a non-conservative change at the site interaction of the inhibitor with the protease. Similarly, receptor binding can be altered without altering catalytic activity by effecting a non-conservative or conservative at a site of interaction of the receptor with the protease.

Antigenic epitopes that contain at least 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, and typically 10-15 amino acids of the MTSP9 polypeptide are provided. These antigenic epitopes are used, for example, to raise antibodies. Antibodies specific for each epitope or combinations thereof and for single and two-chain forms are also provided.

Nucleic acid molecules, vectors and plasmids, cells and expression of MTSP9 polypeptides

Nucleic acid molecules

Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other nucleic sequences which encode substantially the same amino acid sequence as a MTSP9 are contemplated. These include but are not limited to nucleic acid molecules that include all or portions of MTSP9-encoding genes that are altered by the substitution of different codons that encode the amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change.

Nucleic acids

Also provided herein are nucleic acid molecules that encode MTSP9 polypeptides and the encoded proteins. In particular, nucleic acid molecules

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-52-

encoding MTSP9 from animals, including splice variants thereof are provided. The encoded proteins are also provided. Also provided are functional domains thereof. \ For each of the nucleic acid molecules provided, the nucleic acid can be DNA or RNA or PNA or other nucleic acid analogs or can include non-natural nucleotide bases. Also provided are isolated nucleic acid molecules that include a sequence of nucleotides complementary to the nucleotide sequence encoding an MTSP.

Also provided are nucleic acid molecules that encode a single chain or two chain MTSP proteases that have proteolytic activity in an *in vitro* proteolysis assay and that have at least 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity with the full-length of a protease domain of an MTSP9 polypeptide, or that hybridize along their full-length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full-length nucleic acid to a nucleic acid that encode a protease domain, particularly under conditions of moderate, generally high, stringency. As above, the encoded polypeptides contain the protease as a single chain; activated forms thereof can be produced and are provided.

In one embodiment, a nucleic acid molecule that encodes an MTSP, designated MTSP9 is provided. The nucleic acid molecule includes the open reading frame in the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 17. Also provided are nucleic acid molecules that hybridize under conditions of at least low stringency, moderate stringency, and generally high stringency to the following sequence of nucleic acids (SEQ ID No. 5 or 17) particularly to the open reading frame encompassed by nucleotides that encode a single protease domain thereof, or any domain of MTSP9.

In certain embodiments, the isolated nucleic acid fragment hybridizes to the nucleic acid having the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No. 5 or 17 under high stringency conditions, and generally contains the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID Nos. 5 or 17. The protein contains a transmembrane domain (TM) and a serine protease domain.

Also provided, are muteins of the nucleic acid molecules that encode polypeptides in which amino acids are replaced with other amino acids. Among

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-53-

the muteins are those in which the Cys residue-encoding codons, is/are replaced with other amino acid residues, such as a codon encoding a serine. Such muteins are also provided herein. Each of such domains is provided herein as are nucleic acid molecules that include sequences of nucleotides encoding such domains. Some MTSPs can additionally include a LDLR domain, a scavenger-receptor cysteine rich (SRCR) domain and other domains.

The isolated nucleic acid fragment is DNA, including genomic or cDNA, or is RNA, or can include other components, such as protein nucleic acid and other nucleotide analogs. The isolated nucleic acid can include additional components, such as heterologous or native promoters, and other transcriptional and translational regulatory sequences, these genes can be linked to other genes, such as reporter genes or other indicator genes or genes that encode indicators.

Also provided are nucleic acid molecules that hybridize to the above-noted sequences of nucleotides encoding MTSP9 at least at low stringency, moderate stringency, and typically at high stringency, and that encode the protease domain and/or the full-length protein or at least 70%, 80% or 90% of the full-length protease domain or other domains of an MTSP9 or a splice variant or allelic variant thereof. Generally the molecules hybridize under such conditions along their full-length or along at least 70%, 80% or 90% of the full-length for at least one domain and encode at least one domain, such as the protease or extracellular domain, of the polypeptide. In particular, such nucleic acid molecules include any isolated nucleic fragment that encodes at least one domain of a membrane serine protease, that (1) contains a sequence of nucleotides that encodes the protease or a domain thereof, and (2) is selected from among:

- (a) a sequence of nucleotides that encodes the protease or a domain thereof that includes a sequence of nucleotides set forth in SEQ ID Nos. 15 or 17;
- (b) a sequence of nucleotides that encodes such portion or the full-length protease and hybridizes under conditions of high stringency, generally to nucleic acid that is complementary to a mRNA

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-54-

transcript present in a mammalian cell that encodes such protein or fragment thereof;

- (a) a sequence of nucleotides that encodes the protease or a domain thereof that includes a sequence of nucleotides set having at least about 60%, 70%, 80%, 90% or 95% sequence identity the the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17;
- (c) a sequence of nucleotides that encodes a transmembrane protease or domain thereof that includes a sequence of amino acids encoded by such portion or the full-length open reading frame;
- (d) a sequence of nucleotides that encodes the protease or a domain thereof that includes a sequence of nucleotides set having at least about 60%, 70%, 80%, 90% or 95% sequence identity the the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17; and
- (e) a sequence of nucleotides that encodes the transmembrane protease that includes a sequence of amino acids encoded by a sequence of nucleotides that encodes such subunit and hybridizes under conditions of low, moderate or high stringency to DNA that is complementary to the mRNA transcript.

The isolated nucleic acids can contain least 10 nucleotides, 25 nucleotides, 50 nucleotides, 100 nucleotides, 150 nucleotides, or 200 nucleotides or more contiguous nucleotides of an MTSP9-encoding sequence, or a full-length SP coding sequence. In another embodiment, the nucleic acids are smaller than 35, 200 or 500 nucleotides in length. Nucleic acids that hybridize to or are complementary to an MTSP9-encoding nucleic acid molecule can be single or double-stranded. For example, nucleic acids are provided that include a sequence complementary to (specifically are the inverse complement of) at least 10, 25, 50, 100, or 200 nucleotides or the entire coding region of an MTSP9 encoding nucleic acid, particularly the protease domain thereof. For MTSP9 the full-length protein or a domain or active fragment thereof is also provided.

30 Probes, primers, antisense oligonucleotides and dsRNA

Also provided are fragments thereof that can be used as probes or primers and that contain at least about 10 nucleotides, 14 nucleotides, generally

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-55-

at least about 16 nucleotides, often at least about 30 nucleotides. The length of the probe or primer is a function of the size of the genome probed; the larger the genome, the longer the probe or primer required for specific hybridization to a single site. Those of skill in the art can select appropriately sized probes and
5 primers. Generally probes and primers as described are single-stranded. Double stranded probes and primers can be used, if they are denatured when used.

Probes and primers derived from the nucleic acid molecules are provided. Such probes and primers contain at least 8, 14, 16, 30, 100 or more contiguous nucleotides with identity to contiguous nucleotides of an MTSP9, generally,
10 except for nucleotides 634-751 of SEQ ID No. 5 or nucleotides 1162-1279 of SEQ ID No. 17, and probes of at least 30, 50 or 100 contiguous sequence of nucleotides of SEQ ID No. 5, except for nucleotides 634-734 of SEQ ID No. 5 (except for nucleotides 1162-1262 of SEQ ID No. 18). The probes and primers are optionally labelled with a detectable label, such as a radiolabel or a
15 fluorescent tag, or can be mass differentiated for detection by mass spectrometry or other means.

Also provided is an isolated nucleic acid molecule that includes the sequence of molecules that is complementary to the nucleotide sequence encoding MTSP9 or the portion thereof. Double-stranded RNA (dsRNA), such
20 as RNAi is also provided.

Plasmids, Vectors and Cells

Plasmids and vectors containing the nucleic acid molecules are also provided. Cells containing the vectors, including cells that express the encoded proteins are provided. The cell can be a bacterial cell, a yeast cell, a fungal cell,
25 a plant cell, an insect cell or an animal cell. Methods for producing an MTSP or single chain form of the protease domain thereof by, for example, growing the cell under conditions whereby the encoded MTSP is expressed by the cell, and recovering the expressed protein, are provided herein. As noted, for MTSP9, the full-length zymogens and activated proteins and activated (two chain) protease

and single chain protease domains are provided. As described herein, the cells are used for expression of the protein, which can be secreted or expressed in the cytoplasm.

As discussed below, the MTSP9 polypeptide, and catalytically active portions thereof, can be expressed on the surface of a cell. In addition, all or portions thereof can be expressed as a secreted protein using the native signal sequence or a heterologous signal. Alternatively, all or portions of the polypeptide can be expressed as inclusion bodies in the cytoplasm and isolated therefrom. The resulting protein can be treated to refold if necessary.

The above discussion provides an overview and some details of the exemplified MTSP9s.

C. Tumor specificity and tissue expression profiles

Each MTSP has a characteristic tissue expression profile; the MTSPs in particular, although not exclusively expressed or activated in tumors, exhibit characteristic tumor tissue expression or activation profiles. In some instances, MTSPs can have different activity in a tumor cell from a non-tumor cell by virtue of a change in a substrate or cofactor or receptor therefor or other factor that would alter the apparent functional activity of the MTSP. Hence each can serve as a diagnostic marker for particular tumors, by virtue of a level of activity and/or expression or function in a subject (i.e. a mammal, particularly a human) with neoplastic disease, compared to a subject or subjects that do not have the neoplastic disease. In addition, detection of activity (and/or expression) in a particular tissue can be indicative of neoplastic disease. Shed MTSPs in body fluids can be indicative of neoplastic disease. Also, by virtue of the activity and/or expression profiles of each, they can serve as therapeutic targets, such as by administration of modulators of the activity thereof, or, as by administration of a prodrug specifically activated by one of the MTSPs.

Tissue expression profiles

MTSP9

The MTSP9 is highly expressed in the esophagus and expressed at a low level in many other tissues. The MTSP9 transcript is found in kidney (adult and fetal), spleen (adult and fetal), placenta, liver (adult and fetal), thymus, peripheral

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-57-

blood leukocyte, lung (adult and fetal), pancreas, lymph node, bone marrow, trachea, uterus, prostate, testes, ovary and the gland organs (mammary, adrenal, thyroid, pituitary and salivary). MTSP9 is also expressed in esophagus tumor tissues, in a lung carcinoma and, at a lower level, in a colorectal carcinoma, lymphoma, a cervical carcinoma (HeLaS3) and leukemia cell lines.

D. Identification and isolation of MTSP9 polypeptide genes

The MTSP polypeptides and/or domains thereof, can be obtained by methods well known in the art for protein purification and recombinant protein expression. Any method known to those of skill in the art for identification of nucleic acids that encode desired genes can be used. Any method available in the art can be used to obtain a full-length (*i.e.*, encompassing the entire coding region) cDNA or genomic DNA clone encoding an MTSP polypeptide. For example, the polymerase chain reaction (PCR) can be used to amplify a sequence that is expressed in normal and tumor cells or tissues, *e.g.*, nucleic acids encoding an MTSP9 polypeptide (SEQ. Nos: 5 and 17), in a genomic or cDNA library. Oligonucleotide primers that hybridize to sequences at the 3' and 5' termini of the identified sequences can be used as primers to amplify by PCR sequences from a nucleic acid sample (RNA or DNA), generally a cDNA library, from an appropriate source (*e.g.*, tumor or cancer tissue).

PCR can be carried out, *e.g.*, by use of a Perkin-Elmer Cetus thermal cycler and Taq polymerase (Gene Amp[®]). The DNA being amplified can include mRNA or cDNA or genomic DNA from any eukaryotic species. One can choose to synthesize several different degenerate primers, for use in the PCR reactions. It is also possible to vary the stringency of hybridization conditions used in priming the PCR reactions, to amplify nucleic acid homologs (*e.g.*, to obtain *MTSP polypeptide* sequences from species other than humans or to obtain human sequences with homology to MTSP9 polypeptide) by allowing for greater or lesser degrees of nucleotide sequence similarity between the known nucleotide sequence and the nucleic acid homolog being isolated. For cross-species hybridization, low stringency to moderate stringency conditions are used. For same species hybridization, moderately stringent to highly stringent conditions are used. The conditions can be empirically determined.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-58-

After successful amplification of the nucleic acid containing all or a portion of the identified MTSP polypeptide sequence or of a nucleic acid encoding all or a portion of an MTSP polypeptide homolog, that segment can be molecularly cloned and sequenced, and used as a probe to isolate a complete cDNA or genomic clone. This, in turn, permits the determination of the gene's complete nucleotide sequence, the analysis of its expression, and the production of its protein product for functional analysis. Once the nucleotide sequence is determined, an open reading frame encoding the MTSP polypeptide gene protein product can be determined by any method well known in the art for determining open reading frames, for example, using publicly available computer programs for nucleotide sequence analysis. Once an open reading frame is defined, it is routine to determine the amino acid sequence of the protein encoded by the open reading frame. In this way, the nucleotide sequences of the entire MTSP polypeptide genes as well as the amino acid sequences of MTSP polypeptide proteins and analogs can be identified.

Any eukaryotic cell potentially can serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of the MTSP polypeptide gene. The nucleic acids can be isolated from vertebrate, mammalian, human, porcine, bovine, feline, avian, equine, canine, as well as additional primate sources, insects, plants and other organisms. The DNA can be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (*e.g.*, a DNA "library"), by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell (see, *e.g.*, Sambrook *et al.* 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II). Clones derived from genomic DNA can contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones derived from cDNA will contain only exon sequences. For any source, the gene is cloned into a suitable vector for propagation thereof.

In the molecular cloning of the gene from genomic DNA, DNA fragments are generated, some of which will encode the desired gene.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-59-

The DNA can be cleaved at specific sites using various restriction enzymes. Alternatively, one can use DNase in the presence of manganese to fragment the DNA, or the DNA can be physically sheared, for example, by sonication. The linear DNA fragments then can be separated according to size by standard techniques, including but not limited to, agarose and polyacrylamide gel electrophoresis and column chromatography.

- Once the DNA fragments are generated, identification of the specific DNA fragment containing the desired gene can be accomplished in a number of ways. For example, a portion of the MTSP polypeptide (of any species) gene (*e.g.*, a PCR amplification product obtained as described above or an oligonucleotide having a sequence of a portion of the known nucleotide sequence) or its specific RNA, or a fragment thereof be purified and labeled, and the generated DNA fragments can be screened by nucleic acid hybridization to the labeled probe (Benton and Davis, *Science* 196:180 (1977); Grunstein and Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3961 (1975)). Those DNA fragments with substantial homology to the probe will hybridize. It is also possible to identify the appropriate fragment by restriction enzyme digestion(s) and comparison of fragment sizes with those expected according to a known restriction map if such is available or by DNA sequence analysis and comparison to the known nucleotide sequence of MTSP polypeptide. Further selection can be carried out on the basis of the properties of the gene. Alternatively, the presence of the gene can be detected by assays based on the physical, chemical, or immunological properties of its expressed product. For example, cDNA clones, or DNA clones which hybrid-select the proper mRNA, can be selected which produce a protein that, *e.g.*, has similar or identical electrophoretic migration, isoelectric focusing behavior, proteolytic digestion maps, antigenic properties, serine protease activity. If an anti-MTSP polypeptide antibody is available, the protein can be identified by binding of labeled antibody to the putatively MTSP polypeptide synthesizing clones, in an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)-type procedure.

Alternatives to isolating the MTSP9 polypeptide genomic DNA include, but are not limited to, chemically synthesizing the gene sequence from a known

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-60-

sequence or making cDNA to the mRNA that encodes the MTSP polypeptide. For example, RNA for cDNA cloning of the MTSP polypeptide gene can be isolated from cells expressing the protein. The identified and isolated nucleic acids then can be inserted into an appropriate cloning vector. A large number of

5 vector-host systems known in the art can be used. Possible vectors include, but are not limited to, plasmids or modified viruses, but the vector system must be compatible with the host cell used. Such vectors include, but are not limited to, bacteriophages such as lambda derivatives, or plasmids such as pBR322 or pUC plasmid derivatives or the Bluescript vector (Stratagene, La Jolla, CA). The

10 insertion into a cloning vector can, for example, be accomplished by ligating the DNA fragment into a cloning vector which has complementary cohesive termini. If the complementary restriction sites used to fragment the DNA are not present in the cloning vector, the ends of the DNA molecules can be enzymatically modified. Alternatively, any site desired can be produced by ligating nucleotide

15 sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers can include specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction endonuclease recognition sequences. In an alternative method, the cleaved vector and MTSP polypeptide gene can be modified by homopolymeric tailing. Recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation,

20 transfection, infection, electroporation, calcium precipitation and other methods, so that many copies of the gene sequence are generated.

In specific embodiments, transformation of host cells with recombinant DNA molecules that incorporate the isolated MTSP polypeptide gene, cDNA, or synthesized DNA sequence enables generation of multiple copies of the gene.

25 Thus, the gene can be obtained in large quantities by growing transformants, isolating the recombinant DNA molecules from the transformants and, when necessary, retrieving the inserted gene from the isolated recombinant DNA.

E. Vectors, plasmids and cells that contain nucleic acids encoding an MTSP polypeptide or protease domain thereof and expression of MTSP polypeptides

30

Vectors and cells

For recombinant expression of one or more of the MTSP polypeptides, the nucleic acid containing all or a portion of the nucleotide sequence encoding the

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-61-

MTSP polypeptide can be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector that contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein coding sequence. The necessary transcriptional and translational signals can also be supplied by the native promoter for MTSP genes, and/or their flanking regions.

Also provided are vectors that contain nucleic acid encoding the MTSPs. Cells containing the vectors are also provided. The cells include eukaryotic and prokaryotic cells, and the vectors are any suitable for use therein.

Prokaryotic and eukaryotic cells, including endothelial cells, containing the vectors are provided. Such cells include bacterial cells, yeast cells, fungal cells, plant cells, insect cells and animal cells. The cells are used to produce an MTSP polypeptide or protease domain thereof by (a) growing the above-described cells under conditions whereby the encoded MTSP polypeptide or protease domain of the MTSP polypeptide is expressed by the cell, and then (b) recovering the expressed protease domain protein. In the exemplified embodiments, the protease domain is secreted into the medium.

In one embodiment, the vectors include a sequence of nucleotides that encodes a polypeptide that has protease activity and contains all or a portion of only the protease domain, or multiple copies thereof, of an SP protein are provided. Also provided are vectors that comprise a sequence of nucleotides that encodes the protease domain and additional portions of an SP protein up to and including a full length SP protein, as well as multiple copies thereof, are also provided. The vectors can be selected for expression of the SP protein or protease domain thereof in the cell or such that the SP protein is expressed as a secreted protein. Alternatively, the vectors can include signals necessary for secretion of encoded proteins. When the protease domain is expressed the nucleic acid is linked to nucleic acid encoding a secretion signal, such as the *Saccharomyces cerevisiae* α mating factor signal sequence or a portion thereof, or the native signal sequence.

A variety of host-vector systems can be used to express the protein coding sequence. These include but are not limited to mammalian cell systems infected with virus (*e.g.* vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-62-

infected with virus (*e.g.* baculovirus); microorganisms such as yeast containing yeast vectors; or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and specificities. Depending on the host-vector system used, any one of a number
 5 of suitable transcription and translation elements can be used.

Any methods known to those of skill in the art for the insertion of nucleic acid fragments into a vector can be used to construct expression vectors containing a chimeric gene containing appropriate transcriptional/translational control signals and protein coding sequences. These methods can include *in*
 10 *vitro* recombinant DNA and synthetic techniques and *in vivo* recombinants (genetic recombination). Expression of nucleic acid sequences encoding MTSP polypeptide, or domains, derivatives, fragments or homologs thereof, can be regulated by a second nucleic acid sequence so that the genes or fragments thereof are expressed in a host transformed with the recombinant DNA
 15 molecule(s). For example, expression of the proteins can be controlled by any promoter/enhancer known in the art. In a specific embodiment, the promoter is not native to the genes for MTSP polypeptide. Promoters which can be used include but are not limited to the SV40 early promoter (Bernoist and Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981)), the promoter contained in the 3' long terminal
 20 repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto et al., *Cell* 22:787-797 (1980)), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981)), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982)); prokaryotic expression vectors such as the β -lactamase promoter (Villa-Komaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
 25 75:3727-3731 (1978)) or the *tac* promoter (DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 (1983)); see also "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": in *Scientific American* 242:79-94 (1980)); plant expression vectors containing the nopaline synthetase promoter (Herrera-Estrella et al., *Nature* 303:209-213 (1984)) or the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter (Gardner et al., *Nucleic Acids*
 30 *Res.* 9:2871 (1981)), and the promoter of the photosynthetic enzyme ribulose biphosphate carboxylase (Herrera-Estrella et al., *Nature* 310:115-120 (1984)); promoter elements from yeast and other fungi such as the Gal4 promoter, the

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-63-

- alcohol dehydrogenase promoter, the phosphoglycerol kinase promoter, the alkaline phosphatase promoter, and the following animal transcriptional control regions that exhibit tissue specificity and have been used in transgenic animals: elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift et al., *Cell* 38:639-646 (1984); Ornitz et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987)); insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan et al., *Nature* 315:115-122 (1985)), immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl et al., *Cell* 38:647-658 (1984); Adams et al., *Nature* 318:533-538 (1985); Alexander et al., *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987)), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder et al., *Cell* 45:485-495 (1986)), albumin gene control region which is active in liver (Pinckart et al., *Genes and Devel.* 1:268-276 (1987)), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf et al., *Mol. Cell Biol.* 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., *Science* 235:53-58 (1987)), alpha-1 antitrypsin gene control region which is active in liver (Kelsey et al., *Genes and Devel.* 1:161-171 (1987)), beta globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogam et al., *Nature* 315:338-340 (1985); Kollias et al., *Cell* 46:89-94 (1986)), myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells of the brain (Readhead et al., *Cell* 48:703-712 (1987)), myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, *Nature* 314:283-286 (1985)), and gonadotrophic releasing hormone gene control region which is active in gonadotrophs of the hypothalamus (Mason et al., *Science* 234:1372-1378 (1986)).
- 25 In a specific embodiment, a vector is used that contains a promoter operably linked to nucleic acids encoding an MTSP polypeptide, or a domain, fragment, derivative or homolog, thereof, one or more origins of replication, and optionally, one or more selectable markers (e.g., an antibiotic resistance gene). Expression vectors containing the coding sequences, or portions thereof, of an
- 30 MTSP polypeptide, is made, for example, by subcloning the coding portions into the EcoRI restriction site of each of the three pGEX vectors (glutathione S-transferase expression vectors (Smith and Johnson, *Gene* 7:31-40 (1988)). This

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-64-

allows for the expression of products in the correct reading frame. Exemplary vectors and systems for expression of the protease domains of the MTSP polypeptides include the well-known *Pichia* vectors (available, for example, from Invitrogen, San Diego, CA), particularly those designed for secretion of the encoded proteins. The protein can also be expressed cytoplasmically, such as in the inclusion bodies. One exemplary vector is described in the EXAMPLES.

Plasmids for transformation of *E. coli* cells, include, for example, the pET expression vectors (see, U.S. patent 4,952,496; available from NOVAGEN, Madison, WI; see, also literature published by Novagen describing the system). Such plasmids include pET 11a, which contains the T7lac promoter, T7 terminator, the inducible *E. coli* lac operator, and the lac repressor gene; pET 12a-c, which contains the T7 promoter, T7 terminator, and the *E. coli* ompT secretion signal; and pET 15b and pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), which contain a His-Tag™ leader sequence for use in purification with a His column and a thrombin cleavage site that permits cleavage following purification over the column; the T7-lac promoter region and the T7 terminator.

The vectors are introduced into host cells, such as *Pichia* cells and bacterial cells, such as *E. coli*, and the proteins expressed therein. Exemplary *Pichia* strains, include, for example, GS115. Exemplary bacterial hosts contain chromosomal copies of DNA encoding T7 RNA polymerase operably linked to an inducible promoter, such as the lacUV promoter (see, U.S. Patent No. 4,952,496). Such hosts include, but are not limited to, the lysogenic *E. coli* strain BL21(DE3).

Expression and production of proteins

The MTSP domains, derivatives and analogs can be produced by various methods known in the art. For example, once a recombinant cell expressing an MTSP polypeptide, or a domain, fragment or derivative thereof, is identified, the individual gene product can be isolated and analyzed. This is achieved by assays based on the physical and/or functional properties of the protein, including, but not limited to, radioactive labeling of the product followed by analysis by gel electrophoresis, immunoassay, cross-linking to marker-labeled product, and assays of proteolytic activity.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-65-

The MTSP polypeptides can be isolated and purified by standard methods known in the art (either from natural sources or recombinant host cells expressing the complexes or proteins), including but not restricted to column chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, gel exclusion, reversed-phase high pressure and fast protein liquid), differential centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique used for the purification of proteins. Functional properties can be evaluated using any suitable assay known in the art.

Alternatively, once an MTSP polypeptide or its domain or derivative is identified, the amino acid sequence of the protein can be deduced from the nucleotide sequence of the gene which encodes it. As a result, the protein or its domain or derivative can be synthesized by standard chemical methods known in the art (*e.g.* see Hunkapiller et al, *Nature* 310:105-111 (1984)).

Manipulations of MTSP polypeptide sequences can be made at the protein level. Also contemplated herein are MTSP polypeptide proteins, domains thereof, derivatives or analogs or fragments thereof, which are differentially modified during or after translation, *e.g.*, by glycosylation, acetylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to an antibody molecule or other cellular ligand. Any of numerous chemical modifications can be carried out by known techniques, including but not limited to specific chemical cleavage by cyanogen bromide, trypsin, chymotrypsin, papain, V8 protease, NaBH_4 , acetylation, formylation, oxidation, reduction, metabolic synthesis in the presence of tunicamycin and other such agents.

In addition, domains, analogs and derivatives of an MTSP polypeptide can be chemically synthesized. For example, a peptide corresponding to a portion of an MTSP polypeptide, which includes the desired domain or which mediates the desired activity *in vitro* can be synthesized by use of a peptide synthesizer. Furthermore, if desired, nonclassical amino acids or chemical amino acid analogs can be introduced as a substitution or addition into the MTSP polypeptide sequence. Non-classical amino acids include but are not limited to the D-isomers of the common amino acids, α -amino isobutyric acid, 4-aminobutyric acid, Abu,

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-66-

2-aminobutyric acid, ϵ -Abu, ϵ -Ahx, 6-amino hexanoic acid, Aib, 2-amino isobutyric acid, 3-amino propionic acid, ornithine, norleucine, norvaline, hydroxyproline, sarcosine, citrulline, cysteic acid, t-butylglycine, t-butylalanine, phenylglycine, cyclohexylalanine, β -alanine, fluoro-amino acids, designer amino acids such as β -methyl amino acids, Ca-methyl amino acids, Na-methyl amino acids, and amino acid analogs in general. Furthermore, the amino acid can be D (dextrorotary) or L (levorotary).

In cases where natural products are suspected of being mutant or are isolated from new species, the amino acid sequence of the MTSP polypeptide isolated from the natural source, as well as those expressed *in vitro*, or from synthesized expression vectors *in vivo* or *in vitro*, can be determined from analysis of the DNA sequence, or alternatively, by direct sequencing of the isolated protein. Such analysis can be performed by manual sequencing or through use of an automated amino acid sequenator.

15 Modifications

A variety of modifications of the MTSP polypeptides and domains are contemplated herein. An MTSP-encoding nucleic acid molecule can be modified by any of numerous strategies known in the art (Sambrook *et al.* (1990), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 20 Cold Spring Harbor, New York). The sequences can be cleaved at appropriate sites with restriction endonuclease(s), followed by further enzymatic modification if desired, isolated, and ligated *in vitro*. In the production of the gene encoding a domain, derivative or analog of MTSP, care should be taken to ensure that the modified gene retains the original translational reading frame, uninterrupted by 25 translational stop signals, in the gene region where the desired activity is encoded.

Additionally, the MTSP-encoding nucleic acid molecules can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination sequences, or to create variations in coding regions and/or form new 30 restriction endonuclease sites or destroy pre-existing ones, to facilitate further *in vitro* modification. Also, as described herein muteins with primary sequence alterations, such as replacements of Cys residues and elimination or addition of

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-67-

glycosylation sites are contemplated; the MTSP9 of SEQ ID No. 18 has two potential glycosylation sites. Such mutations can be effected by any technique for mutagenesis known in the art, including, but not limited to, chemical mutagenesis and *in vitro* site-directed mutagenesis (Hutchinson et al., *J. Biol.*

- 5 *Chem.* 253:6551-6558 (1978)), use of TAB® linkers (Pharmacia). In one embodiment, for example, an MTSP polypeptide or domain thereof is modified to include a fluorescent label. In other specific embodiments, the MTSP polypeptide is modified to have a heterobifunctional reagent, such as heterobifunctional reagents can be used to crosslink the members of the
- 10 complex.

In addition, domains, analogs and derivatives of an MTSP can be chemically synthesized. For example, a peptide corresponding to a portion of an MTSP, which includes the desired domain or which mediates the desired activity *in vitro* can be synthesized by use of a peptide synthesizer. Furthermore, if

- 15 desired, nonclassical amino acids or chemical amino acid analogs can be introduced as a substitution or addition into the MTSP sequence. Non-classical amino acids include but are not limited to the D-isomers of the common amino acids, α-amino isobutyric acid, 4-aminobutyric acid, Abu, 2-aminobutyric acid, ε-Abu, ε-Ahx, 6-amino hexanoic acid, Aib, 2-amino isobutyric acid, 3-amino
- 20 propionic acid, ornithine, norleucine, norvaline, hydroxyproline, sarcosine, citrulline, cysteic acid, t-butylglycine, t-butylalanine, phenylglycine, cyclohexylalanine, β-alanine, fluoro-amino acids, designer amino acids such as β-methyl amino acids, Ca-methyl amino acids, Na-methyl amino acids, and amino acid analogs in general. Furthermore, the amino acid can be D (dextrorotary) or
- 25 L (levorotary).

F. SCREENING METHODS

The single chain protease domains, as shown herein, can be used in a variety of methods to identify compounds that modulate the activity thereof. For SPs that exhibit higher activity or expression in tumor cells, compounds that

30 inhibit the proteolytic activity are of particular interest. For any SPs that are active at lower levels in tumor cells, compounds or agents that enhance the

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-68-

activity are potentially of interest. In all instances the identified compounds include agents that are candidate cancer treatments.

Several types of assays are exemplified and described herein. It is understood that the protease domains can be used in other assays. It is shown here, however, that the single chain protease domains exhibit catalytic activity. As such they are ideal for *in vitro* screening assays. They can also be used in binding assays.

The MTSP9 full length zymogens, activated enzymes, single and two chain protease domains are contemplated for use in any screening assay known to those of skill in the art, including those provided herein. Hence the following description, if directed to proteolytic assays is intended to apply to use of a single chain protease domain or a catalytically active portion thereof of any SP, including an MTSP9. Other assays, such as binding assays are provided herein, particularly for use with an MTSP9, including any variants, such as splice variants thereof.

1. Catalytic Assays for identification of agents that modulate the protease activity of an SP protein

Methods for identifying a modulator of the catalytic activity of an SP, particularly a single chain protease domain or catalytically active portion thereof, are provided herein. The methods can be practiced by: contacting the MTSP9, a full-length zymogen or activated form, and particularly a single-chain domain thereof, with a substrate of the MTSP9 in the presence of a test substance, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the MTSP9 is assessed, and comparing the activity to a control. For example, a control can be the activity of the MTSP9 assessed by contacting an MTSP9, including a full-length zymogen or activated form, and particularly a single-chain domain thereof, particularly a single-chain domain thereof, with a substrate of the MTSP9, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the MTSP9 is assessed. The results in the presence and absence of the test compounds are compared. A difference in the activity indicates that the test substance modulates the activity of the MTSP9. Activators of MTSP9 activation cleavage are also contemplated; such assays are discussed below.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-69-

In one embodiment a plurality of the test substances are screened simultaneously in the above screening method. In another embodiment, the MTSP9 is isolated from a target cell as a means for then identifying agents that are potentially specific for the target cell.

5 In another embodiment, a test substance is a therapeutic compound, and whereby a difference of the MTSP9 activity measured in the presence and in the absence of the test substance indicates that the target cell responds to the therapeutic compound.

10 One method includes the steps of (a) contacting the MTSP9 polypeptide or protease domain thereof with one or a plurality of test compounds under conditions conducive to interaction between the ligand and the compounds; and (b) identifying one or more compounds in the plurality that specifically binds to the ligand.

15 Another method provided herein includes the steps of a) contacting an MTSP9 polypeptide or protease domain thereof with a substrate of the MTSP9 polypeptide, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the MTSP9 polypeptide is assessed; b) contacting the MTSP9 polypeptide with a substrate of the MTSP9 polypeptide in the presence of a test substance, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the
20 MTSP9 polypeptide is assessed; and c) comparing the activity of the MTSP9 polypeptide assessed in steps a) and b), whereby the activity measured in step a) differs from the activity measured in step b) indicates that the test substance modulates the activity of the MTSP9 polypeptide.

25 In another embodiment, a plurality of the test substances are screened simultaneously. In comparing the activity of an MTSP9 polypeptide in the presence and absence of a test substance to assess whether the test substance is a modulator of the MTSP9 polypeptide, it is unnecessary to assay the activity in parallel, although such parallel measurement is typical. It is possible to measure the activity of the MTSP9 polypeptide at one time point and compare
30 the measured activity to a historical value of the activity of the MTSP9 polypeptide.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-70-

For instance, one can measure the activity of the MTSP9 polypeptide in the presence of a test substance and compare with historical value of the activity of the MTSP9 polypeptide measured previously in the absence of the test substance, and *vice versa*. This can be accomplished, for example, by providing the activity of the MTSP9 polypeptide on an insert or pamphlet provided with a kit for conducting the assay.

Methods for selecting substrates for a particular SP are described in the EXAMPLES, and particular proteolytic assays are exemplified.

Combinations and kits containing the combinations optionally including instructions for performing the assays are provided. The combinations include an MTSP9 polypeptide and a substrate of the MTSP9 polypeptide to be assayed; and, optionally reagents for detecting proteolysis of the substrate. The substrates, which can be chromogenic or fluorogenic molecules, including proteins, subject to proteolysis by a particular MTSP9 polypeptide, can be identified empirically by testing the ability of the MTSP9 polypeptide to cleave the test substrate. Substrates that are cleaved most effectively (*i.e.*, at the lowest concentrations and/or fastest rate or under desirable conditions), are identified.

Additionally provided herein is a kit containing the above-described combination. The kit optionally includes instructions for identifying a modulator of the activity of an MTSP9 polypeptide. Any MTSP9 polypeptide is contemplated as target for identifying modulators of the activity thereof.

2. Binding assays

Also provided herein are methods for identification and isolation of agents, particularly compounds that bind to MTSP9s. The assays are designed to identify agents that bind to the zymogen form, the single chain isolated protease domain (or a protein, other than an MTSP9 polypeptide, that contains the protease domain of an MTSP9 polypeptide), and to the activated form, including the activated form derived from the full length zymogen or from an extended protease domain. The identified compounds are candidates or leads for identification of compounds for treatments of tumors and other disorders and diseases involving aberrant angiogenesis. The MTSP9 polypeptides used in the

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-71-

methods include any MTSP9 polypeptide as defined herein, including the MTSP9 single chain protease domain or proteolytically active portion thereof.

A variety of methods are provided herein. These methods can be performed in solution or in solid phase reactions in which the MTSP9 polypeptide(s) or protease domain(s) thereof are linked, either directly or indirectly via a linker, to a solid support. Screening assays are described in the Examples, and these assays have been used to identify candidate compounds. For purposes herein, all binding assays described above are provided for MTSP9.

10 Methods for identifying an agent, such as a compound, that specifically binds to an MTSP9 single chain protease domain, a zymogen or full-length activated MTSP9 or two chain protease domain thereof are provided herein. The method can be practiced by (a) contacting the MTSP9 with one or a plurality of test agents under conditions conducive to binding between the MTSP9 and an agent; and (b) identifying one or more agents within the plurality that specifically binds to the MTSP9.

For example, in practicing such methods the MTSP9 polypeptide is mixed with a potential binding partner or an extract or fraction of a cell under conditions that allow the association of potential binding partners with the polypeptide. After mixing, peptides, polypeptides, proteins or other molecules that have become associated with an MTSP9 are separated from the mixture. The binding partner that bound to the MTSP9 can then be removed and further analyzed. To identify and isolate a binding partner, the entire protein, for instance the entire disclosed protein of SEQ ID Nos. 6 can be used. Alternatively, a fragment of the protein can be used.

A variety of methods can be used to obtain cell extracts or body fluids, such as blood, serum, urine, sweat, synovial fluid, CSF and other such fluids. For example, cells can be disrupted using either physical or chemical disruption methods. Examples of physical disruption methods include, but are not limited to, sonication and mechanical shearing. Examples of chemical lysis methods include, but are not limited to, detergent lysis and enzyme lysis. A skilled artisan

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-72-

can readily adapt methods for preparing cellular extracts in order to obtain extracts for use in the present methods.

Once an extract of a cell is prepared, the extract is mixed with the MTSP9 under conditions in which association of the protein with the binding partner can occur. A variety of conditions can be used, including conditions that resemble conditions found in the cytoplasm of a human cell or in a body fluid, such as blood. Features, such as osmolarity, pH, temperature, and the concentration of cellular extract used, can be varied to optimize the association of the protein with the binding partner. Similarly, methods for isolation of molecules of interest from body fluids are known.

After mixing under appropriate conditions, the bound complex is separated from the mixture. A variety of techniques can be used to separate the mixture. For example, antibodies specific to an MTSP9 can be used to immunoprecipitate the binding partner complex. Alternatively, standard chemical separation techniques such as chromatography and density/sediment centrifugation can be used.

After removing the non-associated cellular constituents in the extract, the binding partner can be dissociated from the complex using conventional methods. For example, dissociation can be accomplished by altering the salt concentration or pH of the mixture.

To aid in separating associated binding partner pairs from the mixed extract, the MTSP9 can be immobilized on a solid support. For example, the protein can be attached to a nitrocellulose matrix or acrylic beads. Attachment of the protein or a fragment thereof to a solid support aids in separating peptide/binding partner pairs from other constituents found in the extract. The identified binding partners can be either a single protein or a complex made up of two or more proteins.

Alternatively, the nucleic acid molecules encoding the single chain proteases can be used in a yeast two-hybrid system. The yeast two-hybrid system has been used to identify other protein partner pairs and can readily be adapted to employ the nucleic acid molecules herein described.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-73-

Another *in vitro* binding assay, particularly for an MTSP9, uses a mixture of a polypeptide that contains at least the catalytic domain of one of these proteins and one or more candidate binding targets or substrates. After incubating the mixture under appropriate conditions, the ability of the MTSP9 or a polypeptide fragment thereof containing the catalytic domain to bind to or interact with the candidate substrate is assessed. For cell-free binding assays, one of the components includes or is coupled to a detectable label. The label can provide for direct detection, such as radioactivity, luminescence, optical or electron density, *etc.*, or indirect detection such as an epitope tag, an enzyme, *etc.* A variety of methods can be employed to detect the label depending on the nature of the label and other assay components. For example, the label can be detected bound to the solid substrate or a portion of the bound complex containing the label can be separated from the solid substrate, and the label thereafter detected.

15 **3. Detection of signal transduction**

MTSP9, which is a transmembrane protein, can be involved directly or indirectly in signal transduction directly as a cell surface receptor or indirectly by activating proteins, such as pro-growth factors that can initiate signal transduction.

20 In addition, secreted of MTSP9, such as the extracellular domain of MTSP9, can be involved in signal transduction either directly by binding to or interacting with a cell surface receptor or indirectly by activating proteins, such as pro-growth factors that can initiate signal transduction. Assays for assessing signal transduction are well known to those of skill in the art, and can be adapted for use with the MTSP9 polypeptide.

25 Assays for identifying agents that affect or alter signal transduction mediated directly or indirectly, such as via activation of a pro-growth factor, by an MTSP9, particularly the full length or a sufficient portion to anchor the extracellular domain or a functional portion thereof of an MTSP9 on the surface of a cell are provided. Such assays, include, for example, transcription based assays in which modulation of a transduced signal is assessed by detecting an

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-74-

effect on an expression from a reporter gene (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,436,128).

4. Methods for Identifying Agents that Modulate the Expression a Nucleic Acid Encoding an MTSP9

5 Another embodiment provides methods for identifying agents that modulate the expression of a nucleic acid encoding an MTSP9. Such assays use any available means of monitoring for changes in the expression level of the nucleic acids encoding an MTSP9.

10 In one assay format, cell lines that contain reporter gene fusions between the open reading frame of MTSP9 or a domain thereof, particularly the protease domain and any assayable fusion partner can be prepared. Numerous assayable fusion partners are known and readily available including the firefly luciferase gene and the gene encoding chloramphenicol acetyltransferase (Alam *et al.*, *Anal. Biochem.* 188: 245-54 (1990)). Cell lines containing the reporter gene
15 fusions are then exposed to the agent to be tested under appropriate conditions and time. Differential expression of the reporter gene between samples exposed to the agent and control samples identifies agents which modulate the expression of a nucleic acid encoding an MTSP9.

Additional assay formats can be used to monitor the ability of the agent
20 to modulate the expression of a nucleic acid encoding an MTSP9. For instance, mRNA expression can be monitored directly by hybridization to the nucleic acids. Cell lines are exposed to the agent to be tested under appropriate conditions and time and total RNA or mRNA is isolated by standard procedures (see, *e.g.*, Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL,
25 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Probes to detect differences in RNA expression levels between cells exposed to the agent and control cells can be prepared from the nucleic acids. It is typical, but not necessary, to design probes which hybridize only with target nucleic acids under conditions of high stringency. Only highly complementary nucleic acid hybrids form under
30 conditions of high stringency. Accordingly, the stringency of the assay conditions determines the amount of complementarity which should exist between two nucleic acid strands in order to form a hybrid. Stringency should

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-75-

be chosen to maximize the difference in stability between the probe:target hybrid and potential probe:non-target hybrids.

- Probes can be designed from the nucleic acids through methods known in the art. For instance, the G+C content of the probe and the probe length can affect probe binding to its target sequence. Methods to optimize probe specificity are commonly available (see, *e.g.*, Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press); and Ausubel *et al.* (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY).
- Hybridization conditions are modified using known methods (see, *e.g.*, Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press); and Ausubel *et al.* (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY), as required for each probe. Hybridization of total cellular RNA or RNA enriched for polyA RNA can be accomplished in any available format. For instance, total cellular RNA or RNA enriched for polyA RNA can be affixed to a solid support, and the solid support exposed to at least one probe comprising at least one, or part of one of the nucleic acid molecules under conditions in which the probe specifically hybridizes. Alternatively, nucleic acid fragments comprising at least one, or part of one of the sequences can be affixed to a solid support, such as a porous glass wafer. The glass wafer can then be exposed to total cellular RNA or polyA RNA from a sample under conditions in which the affixed sequences specifically hybridize. Such glass wafers and hybridization methods are widely available, for example, those disclosed by Beattie (WO 95/11755). By examining for the ability of a given probe to specifically hybridize to an RNA sample from an untreated cell population and from a cell population exposed to the agent, agents which up or down regulate the expression of a nucleic acid encoding the MTSP9 polypeptide, are identified.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-76-

In one format, the relative amounts of a protein between a cell population that has been exposed to the agent to be tested compared to an un-exposed control cell population can be assayed (*e.g.*, a prostate cancer cell line, a lung cancer cell line, a colon cancer cell line or a breast cancer cell line). In this
5 format, probes, such as specific antibodies, are used to monitor the differential expression or level of activity of the protein in the different cell populations or body fluids. Cell lines or populations or body fluids are exposed to the agent to be tested under appropriate conditions and time. Cellular lysates or body fluids can be prepared from the exposed cell line or population and a control,
10 unexposed cell line or population or unexposed body fluid. The cellular lysates or body fluids are then analyzed with the probe.

For example, N- and C- terminal fragments of the MTSP9 can be expressed in bacteria and used to search for proteins which bind to these fragments. Fusion proteins, such as His-tag or GST fusion to the N- or C-
15 terminal regions of the MTSP9 can be prepared for use as a substrate. These fusion proteins can be coupled to, for example, Glutathione-Sepharose beads and then probed with cell lysates or body fluids. Prior to lysis, the cells or body fluids can be treated with a candidate agent which can modulate an MTSP9 or proteins that interact with domains thereon. Lysate proteins binding to the
20 fusion proteins can be resolved by SDS-PAGE, isolated and identified by protein sequencing or mass spectroscopy, as is known in the art.

Antibody probes are prepared by immunizing suitable mammalian hosts in appropriate immunization protocols using the peptides, polypeptides or proteins if they are of sufficient length (*e.g.*, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20,
25 25, 30, 35, 40 or more consecutive amino acids the MTSP9 polypeptide or if required to enhance immunogenicity, conjugated to suitable carriers. Methods for preparing immunogenic conjugates with carriers, such as bovine serum albumin (BSA), keyhole limpet hemocyanin (KLH), or other carrier proteins are well known in the art. In some circumstances, direct conjugation using, for
30 example, carbodiimide reagents can be effective; in other instances linking reagents such as those supplied by Pierce Chemical Co., Rockford, IL, can be desirable to provide accessibility to the hapten. Hapten peptides can be

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-77-

extended at either the amino or carboxy terminus with a Cys residue or interspersed with cysteine residues, for example, to facilitate linking to a carrier. Administration of the immunogens is conducted generally by injection over a suitable time period and with use of suitable adjuvants, as is generally understood in the art. During the immunization schedule, titers of antibodies are taken to determine adequacy of antibody formation.

Anti-peptide antibodies can be generated using synthetic peptides corresponding to, for example, the carboxy terminal amino acids of the MTSP9. Synthetic peptides can be as small as 1-3 amino acids in length, generally at least 4 or more amino acid residues long. The peptides can be coupled to KLH using standard methods and can be immunized into animals, such as rabbits or ungulates. Polyclonal antibodies can then be purified, for example using Actigel beads containing the covalently bound peptide.

While the polyclonal antisera produced in this way can be satisfactory for some applications, for pharmaceutical compositions, use of monoclonal preparations are generally used. Immortalized cell lines which secrete the desired monoclonal antibodies can be prepared using the standard method of Kohler *et al.*, (*Nature* 256: 495-7 (1975)) or modifications which effect immortalization of lymphocytes or spleen cells, as is generally known. The immortalized cell lines secreting the desired antibodies are screened by immunoassay in which the antigen is the peptide hapten, polypeptide or protein. When the appropriate immortalized cell culture secreting the desired antibody is identified, the cells can be cultured either *in vitro* or by production *in vivo* via ascites fluid. Of particular interest, are monoclonal antibodies that recognize the catalytic domain or activation cleavage site (region) of an MTSP9.

Additionally, the zymogen or two-chain form of the MTSP9 can be used to make monoclonal antibodies that recognize conformation epitopes. The desired monoclonal antibodies are then recovered from the culture supernatant or from the ascites supernatant. Fragments of the monoclonals or the polyclonal antisera which contain the immunologically significant portion can be used as antagonists, as well as the intact antibodies. Use of immunologically reactive fragments, such as the Fab, Fab', or F(ab')₂ fragments are often used, especially

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-78-

in a therapeutic context, as these fragments are generally less immunogenic than the whole immunoglobulin.

The antibodies or fragments can also be produced. Regions that bind specifically to the desired regions of receptor also can be produced in the context of chimeras with multiple species origin.

Agents that are assayed in the above method can be randomly selected or rationally selected or designed.

The agents can be, as examples, peptides, small molecules, and carbohydrates. A skilled artisan can readily recognize that there is no limit as to the structural nature of the agents.

The peptide agents can be prepared using standard solid phase (or solution phase) peptide synthesis methods, as is known in the art. In addition, the DNA encoding these peptides can be synthesized using commercially available oligonucleotide synthesis instrumentation and produced recombinantly using standard recombinant production systems. The production using solid phase peptide synthesis is necessitated if non-gene-encoded amino acids are to be included.

G. Assay formats and selection of test substances that modulate at least one activity of an MTSP9 polypeptide

Methods for identifying agents that modulate at least one activity of an MTSP9 are provided. The methods include phage display and other methods for assessing alterations in the activity of an MTSP9. Such methods or assays can use any means of monitoring or detecting the desired activity. A variety of formats and detection protocols are known for performing screening assays. Any such formats and protocols can be adapted for identifying modulators of MTSP9 polypeptide activities. The following includes a discussion of exemplary protocols.

1. High throughput screening assays

Although the above-described assay can be conducted where a single MTSP9 polypeptide is screened, and/or a single test substance is screened in one assay, the assay typically is conducted in a high throughput screening mode, *i.e.*, a plurality of the SP proteins are screened against and/or a plurality

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-79-

of the test substances are screened simultaneously (See generally, *High Throughput Screening: The Discovery of Bioactive Substances* (Devlin, Ed.) Marcel Dekker, 1997; Sittampalam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1:384-91 (1997); and Silverman et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:397-403 (1998)). For example, the assay can be conducted in a multi-well (e.g., 24-, 48-, 96-, 384-, 1536-well or higher density), chip or array format.

High-throughput screening (HTS) is the process of testing a large number of diverse chemical structures against disease targets to identify "hits" (Sittampalam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1:384-91 (1997)). Current state-of-the-art HTS operations are highly automated and computerized to handle sample preparation, assay procedures and the subsequent processing of large volumes of data.

Detection technologies employed in high-throughput screens depend on the type of biochemical pathway being investigated (Sittampalam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1:384-91 (1997)). These methods include, radiochemical methods, such as the scintillation proximity assays (SPA), which can be adapted to a variety of enzyme assays (Lerner et al., *J. Biomol. Screening*, 1:135-143 (1996); Baker et al., *Anal. Biochem.*, 239:20-24 (1996); Baum et al., *Anal. Biochem.*, 237:129-134 (1996); and Sullivan et al., *J. Biomol. Screening* 2:19-23 (1997)) and protein-protein interaction assays (Braunwalder et al., *J. Biomol. Screening* 1:23-26 (1996); Sonatore et al., *Anal. Biochem.* 240:289-297 (1996); and Chen et al., *J. Biol. Chem.* 271:25308-25315 (1996)), and non-isotopic detection methods, including but are not limited to, colorimetric and luminescence detection methods, resonance energy transfer (RET) methods, time-resolved fluorescence (HTRF) methods, cell-based fluorescence assays, such as fluorescence resonance energy transfer (FRET) procedures (see, e.g., Gonzalez et al., *Biophys. J.*, 69:1272-1280 (1995)), fluorescence polarization or anisotropy methods (see, e.g., Jameson et al., *Methods Enzymol.* 246:283-300 (1995); Jolley, *J. Biomol. Screening* 1:33-38 (1996); Lynch et al., *Anal. Biochem.* 247:77-82 (1997)), fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and other such methods.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-80-

2. Test Substances

Test compounds, including small molecules, antibodies, proteins, nucleic acids, peptides, and libraries and collections thereof, can be screened in the above-described assays and assays described below to identify compounds that modulate the activity of an MTSP9 polypeptide. Rational drug design methodologies that rely on computational chemistry can be used to screen and identify candidate compounds.

The compounds identified by the screening methods include inhibitors, including antagonists, and can be agonists. Compounds for screening include any compounds and collections of compounds available, known or that can be prepared.

a. Selection of Compounds

Compounds can be selected for their potency and selectivity of inhibition of serine proteases, especially an MTSP9 polypeptide. As described herein, and as generally known, a target serine protease and its substrate are combined under assay conditions permitting reaction of the protease with its substrate. The assay is performed in the absence of test compound, and in the presence of increasing concentrations of the test compound. The concentration of test compound at which 50% of the serine protease activity is inhibited by the test compound is the IC_{50} value (Inhibitory Concentration) or EC_{50} (Effective Concentration) value for that compound. Within a series or group of test compounds, those having lower IC_{50} or EC_{50} values are considered more potent inhibitors of the serine protease than those compounds having higher IC_{50} or EC_{50} values. The IC_{50} measurement is often used for more simplistic assays, whereas the EC_{50} is often used for more complicated assays, such as those employing cells.

Typically candidate compounds have an IC_{50} value of 100 nM or less as measured in an *in vitro* assay for inhibition of MTSP9 polypeptide activity. The test compounds also are evaluated for selectivity toward a serine protease. As described herein, and as generally known, a test compound is assayed for its potency toward a panel of serine proteases and other enzymes and an IC_{50} value or EC_{50} value is determined for each test compound in each assay system. A

compound that demonstrates a low IC_{50} value or EC_{50} value for the target enzyme, *e.g.*, MTSP9 polypeptide, and a higher IC_{50} value or EC_{50} value for other enzymes within the test panel (*e.g.*, urokinase tissue plasminogen activator, thrombin, Factor Xa), is considered to be selective toward the target enzyme.

- 5 Generally, a compound is deemed selective if its IC_{50} value or EC_{50} value in the target enzyme assay is at least one order of magnitude less than the next smallest IC_{50} value or EC_{50} value measured in the selectivity panel of enzymes.

Compounds are also evaluated for their activity *in vivo*. The type of assay chosen for evaluation of test compounds depends on the pathological condition to be treated or prevented by use of the compound, as well as the route of administration to be evaluated for the test compound.

For instance, to evaluate the activity of a compound to reduce tumor growth through inhibition of MTSP9 polypeptide, the procedures described by Jankun *et al.*, *Canc. Res.* 57:559-563 (1997) to evaluate PAI-1 can be employed. Briefly, the ATCC cell lines DU145 and LnCaP are injected into SCID mice. After tumors are established, the mice are given test compound according to a dosing regime determined from the compound's *in vitro* characteristics. The Jankun *et al.* compound was administered in water. Tumor volume measurements are taken twice a week for about five weeks. A compound is deemed active if an animal to which the compound was administered exhibited decreased tumor volume, as compared to animals receiving appropriate control compounds.

Another *in vivo* experimental model designed to evaluate the effect of p-aminobenzamidine, a swine protease inhibitor, on reducing tumor volume is described by Billström *et al.*, *Int. J. Cancer* 61:542-547 (1995).

To evaluate the ability of a compound to reduce the occurrence of, or inhibit, metastasis, the procedures described by Kobayashi *et al.* *Int. J. Canc.* 57:727-733d (1994) can be employed. Briefly, a murine xenograft selected for high lung colonization potential is injected into C57B1/6 mice *i.v.* (experimental metastasis) or *s.c.* into the abdominal wall (spontaneous metastasis). Various concentrations of the compound to be tested can be admixed with the tumor cells in Matrigel prior to injection. Daily *i.p.* injections of the test compound are

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-82-

made either on days 1-6 or days 7-13 after tumor inoculation. The animals are sacrificed about three or four weeks after tumor inoculation, and the lung tumor colonies are counted. Evaluation of the resulting data permits a determination as to efficacy of the test compound, optimal dosing and route of administration.

5 The activity of the tested compounds toward decreasing tumor volume and metastasis can be evaluated in model described in Rabbani et al., *Int. J. Cancer* 63:840-845 (1995) to evaluate their inhibitor. There, Mat LyLu tumor cells were injected into the flank of Copenhagen rats. The animals were implanted with osmotic minipumps to continuously administer various doses of
10 test compound for up to three weeks. The tumor mass and volume of experimental and control animals were evaluated during the experiment, as were metastatic growths. Evaluation of the resulting data permits a determination as to efficacy of the test compound, optimal dosing, and route of administration. Some of these authors described a related protocol in Xing et al., *Canc. Res.*
15 57:3585-3593 (1997).

To evaluate the anti-angiogenesis activity of a compound, a rabbit cornea neovascularization model can be employed (see, e.g., Avery et al. (1990) *Arch. Ophthalmol.*, 108:1474-147). Avery et al. describes anesthetizing New Zealand albino rabbits and then making a central corneal incision and forming a radial
20 corneal pocket. A slow release prostaglandin pellet was placed in the pocket to induce neovascularization. Test compound was administered i.p. for five days, at which time the animals were sacrificed. The effect of the test compound is evaluated by review of periodic photographs taken of the limbus, which can be used to calculate the area of neovascular response and, therefore, limbal
25 neovascularization. A decreased area of neovascularization as compared with appropriate controls indicates the test compound was effective at decreasing or inhibiting neovascularization.

An angiogenesis model used to evaluate the effect of a test compound in preventing angiogenesis is described by Min et al. *Canc. Res.* 56:2428-2433
30 (1996). C57BL6 mice receive subcutaneous injections of a Matrigel mixture containing bFGF, as the angiogenesis-inducing agent, with and without the test compound. After five days, the animals are sacrificed and the Matrigel plugs, in

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-83-

which neovascularization can be visualized, are photographed. An experimental animal receiving Matrigel and an effective dose of test compound exhibits less vascularization than a control animal or an experimental animal receiving a less- or non-effective dose of compound.

5 An *in vivo* system designed to test compounds for their ability to limit the spread of primary tumors is described by Crowley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5021-5025 (1993). Nude mice are injected with tumor cells (PC3) engineered to express CAT (chloramphenicol acetyltransferase). Compounds to be tested for their ability to decrease tumor size and/or metastases are
10 administered to the animals, and subsequent measurements of tumor size and/or metastatic growths are made. In addition, the level of CAT detected in various organs provides an indication of the ability of the test compound to inhibit metastasis; detection of less CAT in tissues of a treated animal versus a control animal indicates less CAT-expressing cells migrated to that tissue.

15 *In vivo* experimental modes designed to evaluate the inhibitory potential of a test serine protease inhibitors, using a tumor cell line F3II known to be highly invasive (see, e.g., Alonso et al., *Breast Canc. Res. Treat.* 40:209-223 (1996)). Alonso describes *in vivo* studies for toxicity determination, tumor growth, invasiveness, spontaneous metastasis, experimental lung metastasis,
20 and an angiogenesis assay.

The CAM model (chick embryo chorioallantoic membrane model), first described by L. Ossowski in 1998 (*J. Cell Biol.* 107:2437-2445 (1988)), provides another method for evaluating the inhibitory activity of a test compound. In the CAM model, tumor cells invade through the chorioallantoic
25 membrane containing CAM (with tumor cells in the presence of several serine protease inhibitors results in less or no invasion of the tumor cells through the membrane). Thus, the CAM assay is performed with CAM and tumor cells in the presence and absence of various concentrations of test compound. The invasiveness of tumor cells is measured under such conditions to provide an
30 indication of the compound's inhibitory activity. A compound having inhibitory activity correlates with less tumor invasion.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-84-

The CAM model is also used in a standard assay of angiogenesis (*i.e.*, effect on formation of new blood vessels (Brooks *et al. Methods in Molecular Biology* 129:257-269 (1999)). According to this model, a filter disc containing an angiogenesis inducer, such as basic fibroblast growth factor (bFGF) is placed

5 onto the CAM. Diffusion of the cytokine into the CAM induces local angiogenesis, which can be measured in several ways such as by counting the number of blood vessel branch points within the CAM directly below the filter disc. The ability of identified compounds to inhibit cytokine-induced angiogenesis can be tested using this model. A test compound can either be

10 added to the filter disc that contains the angiogenesis inducer, be placed directly on the membrane or be administered systemically. The extent of new blood vessel formation in the presence and/or absence of test compound can be compared using this model. The formation of fewer new blood vessels in the presence of a test compound would be indicative of anti-angiogenesis activity.

15 Demonstration of anti-angiogenesis activity for inhibitors of an MTSP9 polypeptide indicates a role in angiogenesis for that SP protein.

b. Known serine protease inhibitors

Compounds for screening can be serine protease inhibitors, which can be tested for their ability to inhibit the activity of an MTSP9.

20 Exemplary, serine protease inhibitors for use in the screening assays, include, but are not limited to: Serine Protease Inhibitor 3 (SPI-3) (Chen, *et al. Cytokine*, 11:856-862 (1999)); Aprotinin (Iijima, R., *et al., J. Biochem. (Tokyo)* 126:912-916 (1999)); Kazal-type serine protease inhibitor-like proteins (Niimi, *et al. Eur. J. Biochem.*, 266:282-292 (1999)); Kunitz-type serine protease inhibitor

25 (Ravichandran, S., *et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 55:1814-1821 (1999)); Tissue factor pathway inhibitor-2/Matrix-associated serine protease inhibitor (TFPI-2/MSPI), (Liu, Y. *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 370:112-8 (1999)); Bukunin (Cui, C.Y. *et al. J. Invest. Dermatol.* 113:182-8 (1999)); Nafmostat mesilate (Ryo, R. *et al. Vox Sang.* 76:241-6 (1999)); TPCK (Huang

30 *et al. Oncogene* 18:3431-3439 (1999)); A synthetic cotton-bound serine protease inhibitor (Edwards *et al. Wound Repair Regen.* 7:106-18 (1999)); FUT-175 (Sawada, M. *et al. Stroke* 30:644-50 (1999)); Combination of serine

- protease inhibitor FUT-0175 and thromboxane synthetase inhibitor OKY-046 (Kaminogo *et al. Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 38:704-8; discussion 708-9 (1998)); The rat serine protease inhibitor 2.1 gene (LeCam, A., *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253:311-4 (1998)); A new intracellular serine protease inhibitor expressed in the rat pituitary gland complexes with granzyme B (Hill *et al. FEBS Lett.* 440:361-4 (1998)); 3,4-Dichloroisocoumarin (Hammed *et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 219:132-7 (1998)); LEX032 (Bains *et al. Eur. J. Pharmacol.* 356:67-72 (1998)); N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (Dryjanski *et al. Biochemistry* 37:14151-6 (1998)); Mouse gene for the serine protease inhibitor neuroserpin (P112) (Berger *et al. Gene*, 214:25-33 (1998)); Rat serine protease inhibitor 2.3 gene (Paul *et al. Eur. J. Biochem.* 254:538-46 (1998)); Ecotin (Yang *et al. J. Mol. Biol.* 279:945-57 (1998)); A 14 kDa plant-related serine protease inhibitor (Roch *et al. Dev. Comp. Immunol.* 22(1):1-12 (1998)); Matrix-associated serine protease inhibitor TFPI-2/33 kDa MSPI (Rao *et al. Int. J. Cancer* 76:749-56 (1998)); ONO-3403 (Hiwasa *et al. Cancer Lett.* 126:221-5 (1998)); Bdelestin (Moser *et al. Eur. J. Biochem.* 253:212-20 (1998)); Bikunin (Xu *et al. J. Mol. Biol.* 276:955-66 (1998)); Nafamostat mesilate (Mellgren *et al. Thromb. Haemost.* 79:342-7 (1998)); The growth hormone dependent serine protease inhibitor, Spi 2.1 (Maake *et al. Endocrinology* 138:5630-6 (1997)); Growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor (Kawaguchi *et al. J. Biol. Chem.*, 272:27558-64 (1997)); Heat-stable serine protease inhibitor protein from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Hamdaoui *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238:357-60 (1997)); Human placental Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a Kunitz-type serine protease inhibitor (Shimomura *et al. J. Biol. Chem.* 272:6370-6 (1997)); FUT-187, oral serine protease inhibitor (Shiozaki *et al. Gan To Kagaku Ryoho*, 23(14): 1971-9 (1996)); Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (Mr 33,000, 31,000, and 27,000 (Rao, C.N., *et al., Arch. Biochem. Biophys.*, 335:82-92 (1996)); An irreversible isocoumarin serine protease inhibitor (Palencia, D.D., *et al., Biol. Reprod.*, 55:536-42 (1996)); 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) (Nakabo *et al. J. Leukoc. Biol.* 60:328-36 (1996)); Neuroserpin (Osterwalder, T., *et al.,*

- EMBO J.* **15**:2944-53 (1996)); Human serine protease inhibitor alpha-1-antitrypsin (Forney *et al.* *J. Parasitol.*, **82**:496-502 (1996)); Rat serine protease inhibitor 2.3 (Simar-Blanchet, A.E., *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **236**:638-48 (1996)); Gebaxate mesilate (parodi, F., *et al.*, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **10**:235-7 (1996)); Recombinant serine protease inhibitor, CPTI II (Stankiewicz, M., *et al.*, *Acta Biochim. Pol.*, **43**(3):525-9 (1996)); A cysteine-rich serine protease inhibitor (Guamerin II) (Kim, D.R., *et al.*, *J. Enzym. Inhib.*, **10**:81-91 (1996)); Diisopropylfluorophosphate (Lundqvist, H., *et al.*, *Inflamm. Res.*, **44**(12):510-7 (1995)); Nexin 1 (Yu, D.W., *et al.*, *J. Cell Sci.*, **108**(Pt 12):3867-74 (1995));
- 10 LEX032 (Scalia, R., *et al.*, *Shock*, **4**(4):251-6 (1995)); Protease nexin I (Houenou, L.J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**(3):895-9 (1995)); Chymase-directed serine protease inhibitor (Woodard S.L., *et al.*, *J. Immunol.*, **153**(11):5016-25 (1994)); N-alpha-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone (TLCK) (Bourinbaier, A.S., *et al.*, *Cell Immunol.*, **155**(1):230-6 (1994)); Smp156
- 15 (Ghendler, Y., *et al.*, *Exp. Parasitol.*, **78**(2):121-31 (1994)); Schistosoma haematobium serine protease (Blanton, R.E., *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **63**(1):1-11 (1994)); Spi-1 (Warren, W.C., *et al.*, *Mol. Cell Endocrinol.*, **98**(1):27-32 (1993)); TAME (Jessop, J.J., *et al.*, *Inflammation*, **17**(5):613-31 (1993)); Antithrombin III (Kalaria, R.N., *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **143**(3):886-93 (1993));
- 20 FOY-305 (Ohkoshi, M., *et al.*, *Anticancer Res.*, **13**(4):963-6 (1993)); Camostat mesilate (Senda, S., *et al.*, *Intern. Med.*, **32**(4):350-4 (1993)); Pigment epithelium-derived factor (Steele, F.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**(4):1526-30 (1993)); Antistasin (Holstein, T.W., *et al.*, *FEBS Lett.*, **309**(3):288-92 (1992)); The vaccinia virus K2L gene encodes a serine protease
- 25 inhibitor (Zhou, J., *et al.*, *Virology*, **189**(2):678-86 (1992)); Bowman-Birk serine protease inhibitor (Werner, M.H., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **225**(3):873-89 (1992); FUT-175 (Yanamoto, H., *et al.*, *Neurosurgery*, **30**(3):358-63 (1992)); FUT-175; (Yanamoto, H., *et al.*, *Neurosurgery*, **30**(3):351-6, discussion 356-7 (1992)); PAI-I (Yreadwell, B.V., *et al.*, *J. Orthop. Res.*, **9**(3):309-16 (1991)); 3,4-
- 30 Dichloroisocoumarin (Rusbridge, N.M., *et al.*, *FEBS Lett.*, **268**(1):133-6 (1990)); Alpha 1-antichymotrypsin (Lindmark, B.E., *et al.*, *Am. Rev. Respir. Dis.*, **141**(4 Pt 1):884-8 (1990)); P-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) (Scuderi,

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-87-

- P., *J. Immunol.*, 143(1):168-73 (1989)); Alpha 1-antichymotrypsin (Abraham, C.R., et al., *Cell*, 52(4):487-501 (1988)); Contrapsin (Modha, J., et al., *Parasitology*, 96 (Pt 1):99-109 (1988)); Alpha 2-antiplasmin (Holmes, W.E., et al., *J. Biol. Chem.*, 262(4):1659-64 (1987)); 3,4-dichloroisocoumarin (Harper, J.W., et al., *Biochemistry*, 24(8):1831-41 (1985)); Diisopropylfluorophosphate (Tsutsui, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123(1):271-7 (1984)); Gabexate mesilate (Hesse, B., et al., *Pharmacol. Res. Commun.*, 16(7):637-45 (1984)); Phenyl methyl sulfonyl fluoride (Dufer, J., et al., *Scand. J. Haematol.*, 32(1):25-32 (1984)); Protease inhibitor Cl-2 (McPhalen, C.A., et al., *J. Mol. Biol.*, 168(2):445-7 (1983)); Phenylmethylsulfonyl fluoride (Sekar V., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 89(2):474-8 (1979)); PGE1 (Feinstein, M.D., et al., *Prostaglandine*, 14(6):1075-93 (1977).

c. Combinatorial libraries and other libraries

- The source of compounds for the screening assays, can be libraries, including, but are not limited to, combinatorial libraries. Methods for synthesizing combinatorial libraries and characteristics of such combinatorial libraries are known in the art (See generally, *Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential* (Cortese Ed.) Walter de Gruyter, Inc., 1995; Tietze and Lieb, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2(3):363-71 (1998); Lam, *Anticancer Drug Des.*, 12(3):145-67 (1997); Blaney and Martin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1(1):54-9 (1997); and Schultz and Schultz, *Biotechnol. Prog.*, 12(6):729-43 (1996)).

- Methods and strategies for generating diverse libraries, primarily peptide- and nucleotide-based oligomer libraries, have been developed using molecular biology methods and/or simultaneous chemical synthesis methodologies (see, e.g., Dower et al., *Annu. Rep. Med. Chem.*, 26:271-280 (1991); Fodor et al., *Science*, 251:767-773 (1991); Jung et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31:367-383 (1992); Zuckerman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4505-4509 (1992); Scott et al., *Science*, 249:386-390 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); and Gallop et al., *J. Medicinal Chemistry*, 37:1233-1251 (1994)). The

resulting combinatorial libraries potentially contain millions of compounds and that can be screened to identify compounds that exhibit a selected activity.

The libraries fall into roughly three categories: fusion-protein-displayed peptide libraries in which random peptides or proteins are presented on the surface of phage particles or proteins expressed from plasmids; support-bound synthetic chemical libraries in which individual compounds or mixtures of compounds are presented on insoluble matrices, such as resin beads (*see, e.g.*, Lam et al., *Nature*, 354:82-84 (1991)) and cotton supports (*see, e.g.*, Eichler et al., *Biochemistry* 32:11035-11041 (1993)); and methods in which the compounds are used in solution (*see, e.g.*, Houghten et al., *Nature*, 354:84-86 (1991); Houghten et al., *BioTechniques*, 31:3:412-421 (1992); and Scott et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:40-48 (1994)). There are numerous examples of synthetic peptide and oligonucleotide combinatorial libraries and there are many methods for producing libraries that contain non-peptidic small organic molecules. Such libraries can be based on a basis set of monomers that are combined to form mixtures of diverse organic molecules or that can be combined to form a library based upon a selected pharmacophore monomer.

Either a random or a deterministic combinatorial library can be screened by the presently disclosed and/or claimed screening methods. In either of these two libraries, each unit of the library is isolated and/or immobilized on a solid support. In the deterministic library, one knows *a priori* a particular unit's location on each solid support. In a random library, the location of a particular unit is not known *a priori* although each site still contains a single unique unit. Many methods for preparing libraries are known to those of skill in this art (*see, e.g.*, Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998-4002 (1984), Houghten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5131-5135 (1985)). Combinatorial library generated by the any techniques known to those of skill in the art are contemplated (*see, e.g.*, Table 1 of Schultz and Schultz, *Biotechnol. Prog.*, 12(6):729-43 (1996)) for screening; Bartel et al., *Science*, 261:1411-1418 (1993); Baumbach et al. *BioPharm, (Can)*:24-35 (1992); Bock et al. *Nature*, 355:564-566 (1992); Borman, S., Combinatorial chemists focus on small molecules molecular recognition, and automation, *Chem. Eng. News*,

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-89-

- 2(12):29 (1996); Boublik, et al., Eukaryotic Virus Display: Engineering the Major Surface Glycoproteins of the Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus (ACNPV) for the Presentation of Foreign Proteins on the Virus Surface, *Bio/Technology*, 13:1079-1084 (1995); Brenner, et al., Encoded Combinatorial
- 5 Chemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5381-5383 (1992); Caffisch, et al., Computational Combinatorial Chemistry for *De Novo* Ligand Design: Review and Assessment, *Perspect. Drug Discovery Des.*, 3:51-84 (1995); Cheng, et al., Sequence-Selective Peptide Binding with a Peptido-A,B-*trans*-steroidal Receptor Selected from an Encoded Combinatorial Library, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:1813-
- 10 1814 (1996); Chu, et al., Affinity Capillary Electrophoresis to Identify the Peptide in A Peptide Library that Binds Most Tightly to Vancomycin, *J. Org. Chem.*, 58:648-652 (1993); Clackson, et al., Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries, *Nature*, 352:624-628 (1991); Combs, et al., Protein Structure-Based Combinatorial Chemistry: Discovery of Non-Peptide Binding
- 15 Elements to Src SH3 Domain, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:287-288 (1996); Cwirla, et al., Peptides On Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:6378-6382 (1990); Ecker, et al., Combinatorial Drug Discovery: Which Method will Produce the Greatest Value, *Bio/Technology*, 13:351-360 (1995); Ellington, et al., *In Vitro* Selection of RNA
- 20 Molecules That Bind Specific Ligands, *Nature*, 346:818-822 (1990); Ellman, J.A., Variants of Benzodiazepines, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10997 (1992); Erickson, et al., *The Proteins*; Neurath, H., Hill, R.L., Eds.: Academic: New York, 1976; pp. 255-257; Felici, et al., *J. Mol. Biol.*, 222:301-310 (1991); Fodor, et al., Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis, *Science*,
- 25 251:767-773 (1991); Francisco, et al., Transport and Anchoring of Beta-Lactamase to the External Surface of *E. Coli.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:2713-2717 (1992); Georgiou, et al., Practical Applications of Engineering Gram-Negative Bacterial Cell Surfaces, *TIBTECH*, 11:6-10 (1993); Geysen, et al., Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a
- 30 single amino acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Glaser, et al., Antibody Engineering by Condon-Based Mutagenesis in a Filamentous Phage Vector System, *J. Immunol.*, 149:3903-3913 (1992); Gram, et al., In

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-90-

- vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**:3576-3580 (1992); Han, et al., Liquid-Phase Combinatorial Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**:6419-6423 (1995); Hoogenboom, et al., Multi-Subunit Proteins on the
- 5 Surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody (Fab) Heavy and Light Chains, *Nucleic Acids Res.*, **19**:4133-4137 (1991); Houghten, et al., General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**:5131-5135 (1985); Houghten,
- 10 et al., The Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for the Determination of Peptide Ligands in Radio-Receptor Assays-Opioid-Peptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**:405-412 (1993); Houghten, et al., Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery, *Nature*, **354**:84-86 (1991); Huang, et al., Discovery of New Ligand Binding
- 15 Pathways in Myoglobin by Random Mutagenesis, *Nature Struct. Biol.*, **1**:226-229 (1994); Huse, et al., Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda, *Science*, **246**:1275-1281 (1989); Janda, K.D., New Strategies for the Design of Catalytic Antibodies, *Biotechnol. Prog.*, **6**:178-181 (1990); Jung, et al., Multiple Peptide Synthesis Methods and
- 20 Their Applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**:367-486 (1992); Kang, et al., Linkage of Recognition and Replication Functions By Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**:4363-4366 (1991a); Kang, et al., Antibody Redesign by Chain Shuffling from Random Combinatorial Immunoglobulin Libraries, *Proc. Natl.*
- 25 *Acad. Sci. U.S.A.*, **88**:11120-11123 (1991b); Kay, et al., An M13 Phage Library Displaying Random 38-Amino-Acid-Peptides as a Source of Novel Sequences with Affinity to Selected Targets Genes, *Gene*, **128**:59-65 (1993); Lam, et al., A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature*, **354**:82-84 (1991) (published errata appear in *Nature*, **358**:434 (1992)
- 30 and *Nature*, **360**:768 (1992); Lebl, et al., One Bead One Structure Combinatorial Libraries, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **37**:177-198 (1995); Lerner, et al., Antibodies without Immunization, *Science*, **258**:1313-1314 (1992); Li, et al., Minimization

- of a Polypeptide Hormone, *Science*, 270:1657-1660 (1995); Light, et al., Display of Dimeric Bacterial Alkaline Phosphatase on the Major Coat Protein of Filamentous Bacteriophage, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:1073-1079 (1992); Little, et al., Bacterial Surface Presentation of Proteins and Peptides: An Alternative to Phage Technology, *Trends Biotechnol.*, 11:3-5 (1993); Marks, et al., By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Matthews, et al., Substrate Phage: Selection of Protease Substrates by Monovalent Phage Display, *Science*, 260:1113-1117 (1993); McCafferty, et al., Phage Enzymes: Expression and Affinity Chromatography of Functional Alkaline Phosphatase on the Surface of Bacteriophage, *Protein Eng.*, 4:955-961 (1991); Menger, et al., Phosphatase Catalysis Developed Via Combinatorial Organic Chemistry, *J. Org. Chem.*, 60:6666-6667 (1995); Nicolaou, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34:2289-2291 (1995); Oldenburg, et al., Peptide Ligands for A Sugar-Binding Protein Isolated from a Random Peptide Library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5393-5397 (1992); Parmley, et al., Antibody-Selectable Filamentous fd Phage Vectors: Affinity Purification of Target Genes, *Genes*, 73:305-318 (1988); Pinilla, et al., Synthetic Peptide Combinatorial Libraries (SPCLS)--Identification of the Antigenic Determinant of Beta-Endorphin Recognized by Monoclonal Antibody-3E7, *Gene*, 128:71-76 (1993); Pinilla, et al., Review of the Utility of Soluble Combinatorial Libraries, *Biopolymers*, 37:221-240 (1995); Pistor, et al., Expression of Viral Hemagglutinin On the Surface of *E. Coli.*, *Klin. Wochenschr.*, 66:110-116 (1989); Pollack, et al., Selective Chemical Catalysis by an Antibody, *Science*, 234:1570-1572 (1986); Rigler, et al., Fluorescence Correlations, Single Molecule Detection and Large Number Screening: Applications in Biotechnology, *J. Biotechnol.*, 41:177-186 (1995); Sarvetnick, et al., Increasing the Chemical Potential of the Germ-Line Antibody Repertoire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:4008-4011 (1993); Sastry, et al., Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia Coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:5728-5732 (1989); Scott, et al., Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library, *Science*, 249:386-390 (1990); Sears, et al., Engineering

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-92-

- Enzymes for Bioorganic Synthesis: Peptide Bond Formation, *Biotechnol. Prog.*, **12**:423-433 (1996); Simon, et. al., Peptides: A Modular Approach to Drug Discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**:9367-9371 (1992); Still, et al., Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using
- 5 Encoded Combinatorial Libraries, *Acc. Chem. Res.*, **29**:155-163 (1996); Thompson, et al., Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries, *Chem. Rev.*, **96**:555-600 (1996); Tramontano, et al., Catalytic Antibodies, *Science*, **234**:1566-1570 (1986); Wrighton, et al., Small Peptides as Potent Mimetics of the Protein Hormone Erythropoietin, *Science*, **273**:458-464 (1996); York, et al.,
- 10 Combinatorial mutagenesis of the reactive site region in plasminogen activator inhibitor 1, *J. Biol. Chem.*, **266**:8595-8600 (1991); Zebedee, et al., Human Combinatorial Antibody Libraries to Hepatitis B Surface Antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**:3175-3179 (1992); Zuckerman, et al., Identification of Highest-Affinity Ligands by Affinity Selection from Equimolar Peptide Mixtures
- 15 Generated by Robotic Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**:4505-4509 (1992).

For example, peptides that bind to an MTSP9 polypeptide or a protease domain of an SP protein can be identified using phage display libraries. In an exemplary embodiment, this method can include a) contacting phage from a

20 phage library with the MTSP9 polypeptide or a protease domain thereof; (b) isolating phage that bind to the protein; and (c) determining the identity of at least one peptide coded by the isolated phage to identify a peptide that binds to an MTSP9 polypeptide.

H. Modulators of the activity of MTSP9 polypeptides

- 25 Provided herein are compounds, identified by screening or produced using the MTSP9 polypeptide or protease domain in other screening methods, that modulate the activity of an MTSP9. These compounds act by directly interacting with the MTSP9 polypeptide or by altering transcription or translation thereof. Such molecules include, but are not limited to, antibodies that specifically react
- 30 with an MTSP9 polypeptide, particularly with the protease domain thereof, antisense nucleic acids or double-stranded RNA (dsRNA) such as RNAi, that alter

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-93-

expression of the MTSP9 polypeptide, antibodies, peptide mimetics and other such compounds.

1. Antibodies

Antibodies, including polyclonal and monoclonal antibodies, that
5 specifically bind to the MTSP9 polypeptide provided herein, particularly to the single chain protease domains thereof or the activated forms of the full-length or protease domain or the zymogen form, are provided.

Generally, the antibody is a monoclonal antibody, and typically the
antibody specifically binds to the protease domain of the MTSP9 polypeptide. In
10 particular embodiments, antibodies to each of the single chain and or two chain form of the protease domain of MTSP9 are provided. Also provided are antibodies that specifically bind to any domain of MTSP9 and to two chain forms thereof.

The MTSP9 polypeptide and domains, fragments, homologs and
15 derivatives thereof can be used as immunogens to generate antibodies that specifically bind such immunogens. Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and an Fab expression library. In a specific embodiment, antibodies to human MTSP9 polypeptide are produced. In another embodiment, complexes formed from
20 fragments of MTSP9 polypeptide, which fragments contain the serine protease domain, are used as immunogens for antibody production.

Various procedures known in the art can be used for the production of polyclonal antibodies to MTSP9 polypeptide, its domains, derivatives, fragments or analogs. For production of the antibody, various host animals can be
25 immunized by injection with the native MTSP9 polypeptide or a synthetic version, or a derivative of the foregoing, such as a cross-linked MTSP9 polypeptide. Such host animals include but are not limited to rabbits, mice, rats, etc. Various adjuvants can be used to increase the immunological response, depending on the host species, and include but are not limited to Freund's
30 (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-94-

emulsions, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as bacille Calmette-Guerin (BCG) and corynebacterium parvum.

For preparation of monoclonal antibodies directed towards an MTSP9 polypeptide or domains, derivatives, fragments or analogs thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture can be used. Such techniques include but are not restricted to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983)), and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). In an additional embodiment, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals utilizing recent technology (PCT/US90/02545). Human antibodies can be used and can be obtained by using human hybridomas (Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030 (1983)), or by transforming human B cells with EBV virus *in vitro* (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for the MTSP9 polypeptide together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used.

MTSP9-encoding nucleic acid molecules or portions thereof can be used in DNA immunization protocols to produce antibodies that bind to MTSP9 (see, e.g., U.S. Patent No. 5,795,872 and U.S. Patent No. 5,643,578 and U.S. Patent No. 6,337,072).

Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. patent 4,946,778) can be adapted to produce MTSP9 polypeptide-specific single chain antibodies. An additional embodiment uses the techniques described for the construction of Fab expression libraries (Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989)) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for MTSP9 polypeptide or domains, derivatives, or analogs

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-95-

thereof. Non-human antibodies can be "humanized" by known methods (*see, e.g.,* U.S. Patent No. 5,225,539).

Antibody fragments that specifically bind to MTSP9 polypeptide or epitopes thereof can be generated by techniques known in the art. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragment, which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragment, the Fab fragments that can be generated by treating the antibody molecular with papain and a reducing agent, and Fv fragments.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, *e.g.,* ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). To select antibodies specific for a particular domain of the MTSP9 polypeptide one can assay generated hybridomas for a product that binds to the fragment of the MTSP9 polypeptide that contains such a domain.

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and/or quantitation of MTSP9 polypeptide proteins, *e.g.,* for imaging these proteins, measuring levels thereof in appropriate physiological samples, in, for example, diagnostic methods. In another embodiment, anti-MTSP9 polypeptide antibodies, or fragments thereof, containing the binding domain are used as therapeutic agents.

2. Peptides, Polypeptides and Peptide Mimetics

Provided herein are methods for identifying molecules that bind to and modulate the activity of SP proteins. Included among molecules that bind to SPs, particularly the single chain protease domain or catalytically active fragments thereof, are peptides, polypeptides and peptide mimetics, including cyclic peptides. Peptide mimetics are molecules or compounds that mimic the necessary molecular conformation of a ligand or polypeptide for specific binding to a target molecule such as an MTSP9 polypeptide. In an exemplary embodiment, the peptides, polypeptides and peptide mimetics or peptide mimetics bind to the protease domain of the MTSP9 polypeptide. Such peptides and peptide mimetics include those of antibodies that specifically bind to an MTSP9 polypeptide and, typically, bind to the protease domain of an

MTSP9 polypeptide. The peptides, polypeptides and peptide mimetics identified by methods provided herein can be agonists or antagonists of MTSP9 polypeptides.

Such peptides, polypeptides and peptide mimetics are useful for
5 diagnosing, treating, preventing, and screening for a disease or disorder associated with MTSP9 polypeptide activity in a mammal. In addition, the peptides and peptide mimetics are useful for identifying, isolating, and purifying molecules or compounds that modulate the activity of an MTSP9 polypeptide, or specifically bind to an MTSP9 polypeptide, generally the protease domain of an
10 MTSP9 polypeptide. Low molecular weight peptides and peptide mimetics can have strong binding properties to a target molecule, *e.g.*, an MTSP9 polypeptide or the protease domain of an MTSP9 polypeptide.

Peptides, polypeptides and peptide mimetics that bind to MTSP9 polypeptides as described herein can be administered to mammals, including
15 humans, to modulate MTSP9 polypeptide activity. Thus, methods for therapeutic treatment and prevention of neoplastic diseases comprise administering a peptide, polypeptide or peptide mimetic compound in an amount sufficient to modulate such activity are provided. Thus, also provided herein are methods for treating a subject having such a disease or disorder in which a peptide,
20 polypeptide or peptide mimetic compound is administered to the subject in a therapeutically effective dose or amount.

Compositions containing the peptides, polypeptides or peptide mimetics can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In therapeutic applications, compositions can be administered to a patient already
25 suffering from a disease, as described above, in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the symptoms of the disease and its complications. Amounts effective for this use will depend on the severity of the disease and the weight and general state of the patient and can be empirically determined.

In prophylactic applications, compositions containing the peptides,
30 polypeptides and peptide mimetics are administered to a patient susceptible to or otherwise at risk of a particular disease. Such an amount is defined to be a "prophylactically effective dose". In this use, the precise amounts again depend

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-97-

on the patient's state of health and weight. Accordingly, the peptides, polypeptides and peptide mimetics that bind to an MTSP9 polypeptide can be used to prepare pharmaceutical compositions containing, as an active ingredient, at least one of the peptides or peptide mimetics in association with a pharmaceutical carrier or diluent. The compounds can be administered, for example, by oral, pulmonary, parental (intramuscular, intraperitoneal, intravenous (IV) or subcutaneous injection), inhalation (via a fine powder formulation), transdermal, nasal, vaginal, rectal, or sublingual routes of administration and can be formulated in dosage forms appropriate for each route of administration (see, e.g., International PCT application Nos. WO 93/25221 and WO 94/17784; and European Patent Application 613,683).

Peptides, polypeptides and peptide mimetics that bind to MTSP9 polypeptides are useful *in vitro* as unique tools for understanding the biological role of MTSP9 polypeptides, including the evaluation of the many factors thought to influence, and be influenced by, the production of MTSP9 polypeptide. Such peptides, polypeptides and peptide mimetics are also useful in the development of other compounds that bind to and modulate the activity of an MTSP9 polypeptide, because such compounds provide important information on the relationship between structure and activity that should facilitate such development.

The peptides, polypeptides and peptide mimetics are also useful as competitive binders in assays to screen for new MTSP9 polypeptides or MTSP9 polypeptide agonists. In such assay embodiments, the compounds can be used without modification or can be modified in a variety of ways; for example, by labeling, such as covalently or non-covalently joining a moiety which directly or indirectly provides a detectable signal. In any of these assays, the materials thereto can be labeled either directly or indirectly. Possibilities for direct labeling include label groups such as: radiolabels such as ¹²⁵I enzymes (U.S. Pat. No. 3,645,090) such as peroxidase and alkaline phosphatase, and fluorescent labels (U.S. Pat. No. 3,940,475) capable of monitoring the change in fluorescence intensity, wavelength shift, or fluorescence polarization. Possibilities for indirect labeling include biotinylation of one constituent followed by binding to avidin

-98-

coupled to one of the above label groups. The compounds can also include spacers or linkers in cases where the compounds are to be attached to a solid support.

Moreover, based on their ability to bind to an MTSP9 polypeptide, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can be used as reagents for detecting MTSP9 polypeptides in living cells, fixed cells, in biological fluids, in tissue homogenates and in purified, natural biological materials. For example, by labelling such peptides, polypeptides and peptide mimetics, cells having MTSP9 polypeptides can be identified. In addition, based on their ability to bind an MTSP9 polypeptide, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can be used in *in situ* staining, FACS (fluorescence-activated cell sorting), Western blotting, ELISA and other analytical protocols. Based on their ability to bind to an MTSP9 polypeptide, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can be used in purification of MTSP9 polypeptides or in purifying cells expressing the MTSP9 polypeptides, *e.g.*, a polypeptide encoding the protease domain of an MTSP9 polypeptide.

The peptides, polypeptides and peptide mimetics can also be used as commercial reagents for various medical research and diagnostic uses. The activity of the peptides and peptide mimetics can be evaluated either *in vitro* or *in vivo* in one of the numerous models described in McDonald (1992) *Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology*, 14:8-21.

3. Peptide, polypeptide and peptide mimetic therapy

Peptide analogs are commonly used in the pharmaceutical industry as non-peptide drugs with properties analogous to those of the template peptide. These types of non-peptide compounds are termed "peptide mimetics" or "peptidomimetics" (Luthman *et al.*, *A Textbook of Drug Design and Development*, 14:386-406, 2nd Ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:1699-1720; Fauchere (1986) *J. Adv. Drug Res.*, 15:29; Veber and Freidinger (1985) *TINS*, p. 392; and Evans *et al.* (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229). Peptide mimetics that are structurally similar to therapeutically useful peptides can be used to produce an

-99-

equivalent or enhanced therapeutic or prophylactic effect. Preparation of peptidomimetics and structures thereof are known to those of skill in this art.

Systematic substitution of one or more amino acids of a consensus sequence with a D-amino acid of the same type (*e.g.*, D-lysine in place of
5 L-lysine) can be used to generate more stable peptides. In addition, constrained peptides containing a consensus sequence or a substantially identical consensus sequence variation can be generated by methods known in the art (Rizo *et al.* (1992) *An. Rev. Biochem.*, 61:387, incorporated herein by reference); for example, by adding internal cysteine residues capable of forming intramolecular
10 disulfide bridges which cyclize the peptide.

Those skilled in the art appreciate that modifications can be made to the peptides and mimetics without deleteriously effecting the biological or functional activity of the peptide. Further, the skilled artisan would know how to design non-peptide structures in three dimensional terms, that mimic the peptides that
15 bind to a target molecule, *e.g.*, an MTSP9 polypeptide or, generally, the protease domain of MTSP9 polypeptides (see, *e.g.*, Eck and Sprang (1989) *J. Biol. Chem.*, 26: 17605-18795).

When used for diagnostic purposes, the peptides and peptide mimetics can be labeled with a detectable label and, accordingly, the peptides and peptide
20 mimetics without such a label can serve as intermediates in the preparation of labeled peptides and peptide mimetics. Detectable labels can be molecules or compounds, which when covalently attached to the peptides and peptide mimetics, permit detection of the peptide and peptide mimetics *in vivo*, for example, in a patient to whom the peptide or peptide mimetic has been
25 administered, or *in vitro*, *e.g.*, in a sample or cells. Suitable detectable labels are well known in the art and include, by way of example, radioisotopes, fluorescent labels (*e.g.*, fluorescein), and the like. The particular detectable label employed is not critical and is selected to be detectable at non-toxic levels. Selection of the such labels is well within the skill of the art.

30 Covalent attachment of a detectable label to the peptide or peptide mimetic is accomplished by conventional methods well known in the art. For example, when the ¹²⁵I radioisotope is employed as the detectable label, covalent

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-100-

attachment of ^{125}I to the peptide or the peptide mimetic can be achieved by incorporating the amino acid tyrosine into the peptide or peptide mimetic and then iodinating the peptide (see, *e.g.*, Weaner *et al.* (1994) *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*, pp. 137-140). If tyrosine is not present in the peptide or peptide mimetic, incorporation of tyrosine to the N or C terminus of the peptide or peptide mimetic can be achieved by well known chemistry. Likewise, ^{32}P can be incorporated onto the peptide or peptide mimetic as a phosphate moiety through, for example, a hydroxyl group on the peptide or peptide mimetic using conventional chemistry.

10 Labeling of peptidomimetics usually involves covalent attachment of one or more labels, directly or through a spacer (*e.g.*, an amide group), to non-interfering position(s) on the peptidomimetic that are predicted by quantitative structure-activity data and/or molecular modeling. Such non-interfering positions generally are positions that do not form direct contacts with the macromolecules(s) to which the peptidomimetic binds to produce the therapeutic effect. Derivatization (*e.g.*, labeling) of peptidomimetics should not substantially interfere with the desired biological or pharmacological activity of the peptidomimetic.

20 Peptides, polypeptides and peptide mimetics that can bind to an MTSP9 polypeptide or the protease domain of MTSP9 polypeptides and/or modulate the activity thereof, or exhibit MTSP9 polypeptide activity, can be used for treatment of neoplastic disease. The peptides, polypeptides and peptide mimetics can be delivered, *in vivo* or *ex vivo*, to the cells of a subject in need of treatment. Further, peptides which have MTSP9 polypeptide activity can be delivered, *in vivo* or *ex vivo*, to cells which carry mutant or missing alleles encoding the MTSP9 polypeptide gene. Any of the techniques described herein or known to the skilled artisan can be used for preparation and *in vivo* or *ex vivo* delivery of such peptides, polypeptides and peptide mimetics that are substantially free of other human proteins. For example, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can be readily prepared by expression in a microorganism or synthesis *in vitro*.

The peptides or peptide mimetics can be introduced into cells, *in vivo* or *ex vivo*, by microinjection or by use of liposomes, for example. Alternatively, the peptides, polypeptides or peptide mimetics can be taken up by cells, *in vivo* or *ex vivo*, actively or by diffusion. In addition, extracellular application of the

5 peptide, polypeptide or peptide mimetic can be sufficient to effect treatment of a neoplastic disease. Other molecules, such as drugs or organic compounds, that: 1) bind to a MTSP9 polypeptide or protease domain thereof; or 2) have a similar function or activity to an MTSP9 polypeptide or protease domain thereof, can be used in methods for treatment.

10 **4. Rational drug design**

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides or peptides of interest or of small molecules or peptide mimetics with which they interact (*e.g.*, agonists and antagonists) in order to fashion drugs which are, *e.g.*, more active or stable forms thereof; or
15 which, for example, enhance or interfere with the function of a polypeptide *in vivo* (*e.g.*, an MTSP9 polypeptide). In one approach, one first determines the three-dimensional structure of a protein of interest (*e.g.*, an MTSP9 polypeptide or polypeptide having a protease domain) or, for example, of an MTSP9 polypeptide-ligand complex, by X-ray crystallography, by computer modeling or
20 most typically, by a combination of approaches (see, *e.g.*, Erickson *et al.* 1990). Also, useful information regarding the structure of a polypeptide can be gained by modeling based on the structure of homologous proteins. In addition, peptides can be analyzed by an alanine scan. In this technique, an amino acid residue is replaced by Ala, and its effect on the peptide's activity is determined.
25 Each of the amino acid residues of the peptide is analyzed in this manner to determine the important regions of the peptide.

Also, a polypeptide or peptide that binds to an MTSP9 polypeptide or, generally, the protease domain of an MTSP9 polypeptide, can be selected by a functional assay, and then the crystal structure of this polypeptide or peptide
30 can be determined. The polypeptide can be, for example, an antibody specific for an MTSP9 polypeptide or the protein domain of an MTSP9 polypeptide. This approach can yield a pharmacophore upon which subsequent drug design can be

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-102-

based. Further, it is possible to bypass the crystallography altogether by generating anti-idiotypic polypeptides or peptides, (anti-ids) to a functional, pharmacologically active polypeptide or peptide that binds to an MTSP9 polypeptide or protease domain of an MTSP9 polypeptide. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids is expected to be an analog of the original target molecule, e.g., an MTSP9 polypeptide or polypeptide having an MTSP9 polypeptide. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced banks of peptides. Selected peptides would then act as the pharmacophore.

Thus, one can design drugs which have, for example, improved activity or stability or which act as modulators (*e.g.*, inhibitors, agonists or antagonists) of MTSP9 polypeptide activity, and are useful in the methods, particularly the methods for diagnosis, treatment, prevention, and screening of a neoplastic disease. By virtue of the availability of nucleic acid that encodes MTSP9 polypeptides, sufficient amounts of the MTSP9 polypeptide can be made available to perform such analytical studies as X-ray crystallography. In addition, the knowledge of the amino acid sequence of an MTSP9 polypeptide or the protease domain thereof, *e.g.*, the protease domain encoded by the amino acid sequence of SEQ ID Nos. 5 and 6, can provide guidance on computer modeling techniques in place of, or in addition to, X-ray crystallography.

Methods of identifying peptides and peptide mimetics that bind to MTSP9 polypeptides

Peptides having a binding affinity to the MTSP9 polypeptide provided herein (*e.g.*, an MTSP9 polypeptide or a polypeptide having a protease domain of an MTSP9 polypeptide) can be readily identified, for example, by random peptide diversity generating systems coupled with an affinity enrichment process. Specifically, random peptide diversity generating systems include the "peptides on plasmids" system (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,270,170 and 5,338,665); the "peptides on phage" system (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 6,121,238 and Cwirla, *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:6378-6382); the "polysome system;" the "encoded synthetic library (ESL)" system; and the "very

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-103-

large scale immobilized polymer synthesis" system (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 6,121,238; and Dower *et al.* (1991) *An. Rep. Med. Chem.* 26:271-280

For example, using the procedures described above, random peptides can generally be designed to have a defined number of amino acid residues in length (e.g., 12). To generate the collection of oligonucleotides encoding the random peptides, the codon motif (NNK)_x, where N is nucleotide A, C, G, or T (equimolar; depending on the methodology employed, other nucleotides can be employed), K is G or T (equimolar), and x is an integer corresponding to the number of amino acids in the peptide (e.g., 12) can be used to specify any one of the 32 possible codons resulting from the NNK motif: 1 for each of 12 amino acids, 2 for each of 5 amino acids, 3 for each of 3 amino acids, and only one of the three stop codons. Thus, the NNK motif encodes all of the amino acids, encodes only one stop codon, and reduces codon bias.

The random peptides can be presented, for example, either on the surface of a phage particle, as part of a fusion protein containing either the pIII or the pVIII coat protein of a phage fd derivative (peptides on phage) or as a fusion protein with the LacI peptide fusion protein bound to a plasmid (peptides on plasmids). The phage or plasmids, including the DNA encoding the peptides, can be identified and isolated by an affinity enrichment process using immobilized MTSP9 polypeptide having a protease domain. The affinity enrichment process, sometimes called "panning," typically involves multiple rounds of incubating the phage, plasmids, or polysomes with the immobilized MTSP9 polypeptide, collecting the phage, plasmids, or polysomes that bind to the MTSP9 polypeptide (along with the accompanying DNA or mRNA), and producing more of the phage or plasmids (along with the accompanying LacI-peptide fusion protein) collected.

Characteristics of peptides and peptide mimetics

Among the peptides, polypeptides and peptide mimetics for therapeutic application are those of having molecular weights from about 250 to about 8,000 daltons. If such peptides are oligomerized, dimerized and/or derivatized with a hydrophilic polymer (e.g., to increase the affinity and/or activity of the compounds), the molecular weights of such peptides can be substantially greater and can range anywhere from about 500 to about 120,000 daltons, generally

from about 8,000 to about 80,000 daltons. Such peptides can contain 9 or more amino acids that are naturally occurring or synthetic (non-naturally occurring) amino acids. One skilled in the art can determine the affinity and molecular weight of the peptides and peptide mimetics suitable for therapeutic and/or diagnostic purposes (*e.g.*, see Dower *et al.*, U.S. Patent No. 6,121,238).

The peptides can be covalently attached to one or more of a variety of hydrophilic polymers. Suitable hydrophilic polymers include, but are not limited to, polyalkylethers as exemplified by polyethylene glycol and polypropylene glycol, polylactic acid, polyglycolic acid, polyoxyalkenes, polyvinylalcohol, polyvinylpyrrolidone, cellulose and cellulose derivatives, dextran and dextran derivatives. When the peptide compounds are derivatized with such polymers, their solubility and circulation half-lives can be increased with little, if any, diminishment in their binding activity. The peptide compounds can be dimerized and each of the dimeric subunits can be covalently attached to a hydrophilic polymer. The peptide compounds can be PEGylated, *i.e.*, covalently attached to polyethylene glycol (PEG).

5. Methods of preparing peptides and peptide mimetics

Peptides that bind to MTSP9 polypeptides can be prepared by classical methods known in the art, for example, by using standard solid phase techniques. The standard methods include exclusive solid phase synthesis, partial solid phase synthesis methods, fragment condensation, classical solution synthesis, and even by recombinant DNA technology (see, *e.g.*, Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149, incorporated herein by reference.)

Using the "encoded synthetic library" or "very large scale immobilized polymer synthesis" systems (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,925,525, and 5,902,723), the minimum size of a peptide with the activity of interest can be determined. In addition all peptides that form the group of peptides that differ from the desired motif (or the minimum size of that motif) in one, two, or more residues can be prepared. This collection of peptides then can be screened for the ability to bind to the target molecule, *e.g.*, MTSP9 polypeptide or, generally, the protease domain of an MTSP9 polypeptide. This immobilized polymer synthesis system or other peptide synthesis methods can also be used to

synthesize truncation analogs and deletion analogs and combinations of truncation and deletion analogs of the peptide compounds.

These procedures can also be used to synthesize peptides in which amino acids other than the 20 naturally occurring, genetically encoded amino acids are substituted at one, two, or more positions of the peptide. For instance, naphthylalanine can be substituted for tryptophan, facilitating synthesis. Other synthetic amino acids that can be substituted into the peptides include L-hydroxypropyl, L-3, 4-dihydroxy-phenylalanyl, D amino acids such as L-d-hydroxylysyl and D-d-methylalanyl, L- α -methylalanyl, β amino acids, and isoquinolyl. D amino acids and non-naturally occurring synthetic amino acids can also be incorporated into the peptides (see, *e.g.*, Roberts *et al.* (1983) *Unusual Amino/Acids in Peptide Synthesis*, 5(6):341-449).

The peptides also can be modified by phosphorylation (see, *e.g.*, W. Bannwarth *et al.* (1996) *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 6(17):2141-2146), and other methods for making peptide derivatives (see, *e.g.*, Hruby *et al.* (1990) *Biochem. J.*, 268(2):249-262). Thus, peptide compounds also serve as a basis to prepare peptide mimetics with similar or improved biological activity.

Those of skill in the art recognize that a variety of techniques are available for constructing peptide mimetics with the same or similar desired biological activity as the corresponding peptide compound but with more favorable activity than the peptide with respect to solubility, stability, and susceptibility to hydrolysis and proteolysis (see, *e.g.*, Morgan *et al.* (1989) *An. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252). Methods for preparing peptide mimetics modified at the N-terminal amino group, the C-terminal carboxyl group, and/or changing one or more of the amido linkages in the peptide to a non-amido linkage are known to those of skill in the art.

Amino terminus modifications include, but are not limited to, alkylating, acetylating and adding a carbobenzoyl group, forming a succinimide group (see, *e.g.*, Murray *et al.* (1995) *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed., John Wiley and Sons, Inc.). C-terminal

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-106-

modifications include mimetics wherein the C-terminal carboxyl group is replaced by an ester, an amide or modifications to form a cyclic peptide.

In addition to N-terminal and C-terminal modifications, the peptide compounds, including peptide mimetics, can advantageously be modified with or covalently coupled to one or more of a variety of hydrophilic polymers. It has been found that when peptide compounds are derivatized with a hydrophilic polymer, their solubility and circulation half-lives can be increased and their immunogenicity is masked, with little, if any, diminishment in their binding activity. Suitable nonproteinaceous polymers include, but are not limited to, polyalkylethers as exemplified by polyethylene glycol and polypropylene glycol, polylactic acid, polyglycolic acid, polyoxyalkenes, polyvinylalcohol, polyvinylpyrrolidone, cellulose and cellulose derivatives, dextran and dextran derivatives. Generally, such hydrophilic polymers have an average molecular weight ranging from about 500 to about 100,000 daltons, including from about 2,000 to about 40,000 daltons and, from about 5,000 to about 20,000 daltons. The hydrophilic polymers also can have an average molecular weights of about 5,000 daltons, 10,000 daltons and 20,000 daltons.

Methods for derivatizing peptide compounds or for coupling peptides to such polymers have been described (see, e.g., Zallipsky (1995) *Bioconjugate Chem.*, 6:150-165; Monfardini *et al.* (1995) *Bioconjugate Chem.*, 6:62-69; U.S. Pat. No. 4,640,835; U.S. Pat. No. 4,496,689; U.S. Pat. No. 4,301,144; U.S. Pat. No. 4,670,417; U.S. Pat. No. 4,791,192; U.S. Pat. No. 4,179,337 and WO 95/34326, all of which are incorporated by reference in their entirety herein).

Other methods for making peptide derivatives are described, for example, in Hruby *et al.* (1990), *Biochem J.*, 268(2):249-262, which is incorporated herein by reference. Thus, the peptide compounds also serve as structural models for non-peptidic compounds with similar biological activity. Those of skill in the art recognize that a variety of techniques are available for constructing compounds with the same or similar desired biological activity as a particular peptide compound but with more favorable activity with respect to solubility, stability, and susceptibility to hydrolysis and proteolysis (see, e.g., Morgan *et al.* (1989) *An. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252, incorporated herein by

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-107-

reference). These techniques include replacing the peptide backbone with a backbone composed of phosphonates, amidates, carbamates, sulfonamides, secondary amines, and N-methylamino acids.

Peptide compounds can exist in a cyclized form with an intramolecular
 5 disulfide bond between the thiol groups of the cysteines. Alternatively, an intermolecular disulfide bond between the thiol groups of the cysteines can be produced to yield a dimeric (or higher oligomeric) compound. One or more of the cysteine residues can also be substituted with a homocysteine.

I. Conjugates

10 A conjugate, containing: a) a single chain protease domain (or proteolytically active portion thereof) of an MTSP9 polypeptide or a full length zymogen, activated form thereof, or two or single chain protease domain thereof; and b) a targeting agent linked to the MTSP9 polypeptide directly or via a linker, wherein the agent facilitates: i) affinity isolation or purification of the
 15 conjugate; ii) attachment of the conjugate to a surface; iii) detection of the conjugate; or iv) targeted delivery to a selected tissue or cell, is provided herein. The conjugate can be a chemical conjugate or a fusion protein mixture thereof.

The targeting agent can be a protein or peptide fragment, such as a tissue specific or tumor specific monoclonal antibody or growth factor or
 20 fragment thereof linked either directly or via a linker to an MTSP9 polypeptide or a protease domain thereof. The targeting agent can also be a protein or peptide fragment that contains a protein binding sequence, a nucleic acid binding sequence, a lipid binding sequence, a polysaccharide binding sequence, or a metal binding sequence, or a linker for attachment to a solid support. In a
 25 particular embodiment, the conjugate contains a) the MTSP9 or portion thereof, as described herein; and b) a targeting agent linked to the MTSP9 polypeptide directly or via a linker.

Conjugates, such as fusion proteins and chemical conjugates, of the MTSP9 polypeptide with a protein or peptide fragment (or plurality thereof) that
 30 functions, for example, to facilitate affinity isolation or purification of the MTSP9 polypeptide domain, attachment of the MTSP9 polypeptide domain to a surface, or detection of the MTSP9 polypeptide domain are provided. The conjugates can

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-108-

be produced by chemical conjugation, such as via thiol linkages, and can be produced by recombinant means as fusion proteins. In the fusion protein, the peptide or fragment thereof is linked to either the N-terminus or C-terminus of the MTSP9 polypeptide domain. In chemical conjugates the peptide or fragment
5 thereof can be linked anywhere that conjugation can be effected, and there can be a plurality of such peptides or fragments linked to a single MTSP9 polypeptide domain or to a plurality thereof.

The targeting agent is for *in vitro* or *in vivo* delivery to a cell or tissue, and includes agents such as cell or tissue-specific antibodies, growth factors and
10 other factors that bind to moieties expressed on specific cells; and other cell or tissue specific agents that promote directed delivery of a linked protein. The targeting agent can be one that specifically delivers the MTSP9 polypeptide to selected cells by interaction with a cell surface protein and internalization of conjugate or MTSP9 polypeptide portion thereof.

15 These conjugates are used in a variety of methods and are particularly suited for use in methods of activation of prodrugs, such as prodrugs that upon cleavage by the particular MTSP9, which is localized at or near the targeted cell or tissue, are cytotoxic. The prodrugs are administered prior to, or simultaneously with, or subsequently to the conjugate. Upon delivery to the
20 targeted cells, the protease activates the prodrug, which then exhibits a therapeutic effect, such as a cytotoxic effect.

1. Conjugation

Conjugates with linked MTSP9 polypeptide domains can be prepared either by chemical conjugation, recombinant DNA technology, or combinations of
25 recombinant expression and chemical conjugation. The MTSP9 polypeptide domains and the targeting agent can be linked in any orientation and more than one targeting agents and/or MTSP9 polypeptide domains can be present in a conjugate.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-109-

a. Fusion proteins

Fusion proteins are provided herein. A fusion protein contains: a) one or a plurality of domains of an MTSP9 polypeptide and b) a targeting agent. The fusion proteins are generally produced by recombinant expression of nucleic acids that encode the fusion protein.

b. Chemical conjugation

To effect chemical conjugation herein, the MTSP9 polypeptide domain is linked via one or more selected linkers or directly to the targeting agent. Chemical conjugation must be used if the targeted agent is other than a peptide or protein, such as a nucleic acid or a non-peptide drug. Any means known to those of skill in the art for chemically conjugating selected moieties can be used.

2. Linkers

Linkers for two purposes are contemplated herein. The conjugates can include one or more linkers between the MTSP9 polypeptide portion and the targeting agent. Additionally, linkers are used for facilitating or enhancing immobilization of an MTSP9 polypeptide or portion thereof on a solid support, such as a microtiter plate, silicon or silicon-coated chip, glass or plastic support, such as for high throughput solid phase screening protocols.

Any linker known to those of skill in the art for preparation of conjugates can be used herein. These linkers are typically used in the preparation of chemical conjugates; peptide linkers can be incorporated into fusion proteins.

Linkers can be any moiety suitable to associate a domain of MTSP9 polypeptide and a targeting agent. Such linkers and linkages include, but are not limited to, peptidic linkages, amino acid and peptide linkages, typically containing between one and about 60 amino acids, more generally between about 10 and 30 amino acids, chemical linkers, such as heterobifunctional cleavable cross-linkers, including but are not limited to, N-succinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoate, sulfosuccinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoate, 4-succinimidyl-oxy carbonyl-a- (2-pyridyldithio)toluene, sulfosuccinimidyl-6- [a-methyl-a- (pyridyldithio)-toluamido] hexanoate, N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) -propionate, succinimidyl 6[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate, sulfosuccinimidyl 6[3-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoate, 3-(2-pyridyldi-

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-110-

thio)-propionyl hydrazide, Ellman's reagent, dichlorotriazinic acid, and S-(2-thiopyridyl)-L-cysteine. Other linkers include, but are not limited to peptides and other moieties that reduce steric hindrance between the domain of MTSP9 polypeptide and the targeting agent, intracellular enzyme substrates, linkers that
 5 increase the flexibility of the conjugate, linkers that increase the solubility of the conjugate, linkers that increase the serum stability of the conjugate, photocleavable linkers and acid cleavable linkers.

Other exemplary linkers and linkages that are suitable for chemically linked conjugates include, but are not limited to, disulfide bonds, thioether
 10 bonds, hindered disulfide bonds, and covalent bonds between free reactive groups, such as amine and thiol groups. These bonds are produced using heterobifunctional reagents to produce reactive thiol groups on one or both of the polypeptides and then reacting the thiol groups on one polypeptide with reactive thiol groups or amine groups to which reactive maleimido groups or thiol
 15 groups can be attached on the other. Other linkers include, acid cleavable linkers, such as bismaleimideethoxy propane, acid labile-transferrin conjugates and adipic acid dihydrazide, that would be cleaved in more acidic intracellular compartments; cross linkers that are cleaved upon exposure to UV or visible light and linkers, such as the various domains, such as C_H1, C_H2, and C_H3, from
 20 the constant region of human IgG, (see, Batra *et al. Molecular Immunol.*, 30:379-386 (1993)). In some embodiments, several linkers can be included in order to take advantage of desired properties of each linker.

Chemical linkers and peptide linkers can be inserted by covalently coupling the linker to the domain of MTSP9 polypeptide and the targeting agent.
 25 The heterobifunctional agents, described below, can be used to effect such covalent coupling. Peptide linkers can also be linked by expressing DNA encoding the linker and therapeutic agent (TA), linker and targeted agent, or linker, targeted agent and therapeutic agent (TA) as a fusion protein. Flexible linkers and linkers that increase solubility of the conjugates are contemplated for
 30 use, either alone or with other linkers are also contemplated herein.

a) Acid cleavable, photocleavable and heat sensitive linkers

Acid cleavable linkers, photocleavable and heat sensitive linkers can also be used, particularly where it can be necessary to cleave the domain of MTSP9 polypeptide to permit it to be more readily accessible to reaction. Acid cleavable linkers include, but are not limited to, bismaleimideethoxy propane; and adipic acid dihydrazide linkers (see, *e.g.*, Fattom *et al.* (1992) *Infection & Immun.* 60:584-589) and acid labile transferrin conjugates that contain a sufficient portion of transferrin to permit entry into the intracellular transferrin cycling pathway (see, *e.g.*, Welhöner *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:4309-4314).

Photocleavable linkers are linkers that are cleaved upon exposure to light (see, *e.g.*, Goldmacher *et al.* (1992) *Bioconj. Chem.* 3:104-107, which linkers are herein incorporated by reference), thereby releasing the targeted agent upon exposure to light. Photocleavable linkers that are cleaved upon exposure to light are known (see, *e.g.*, Hazum *et al.* (1981) in *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110, which describes the use of a nitrobenzyl group as a photocleavable protective group for cysteine; Yen *et al.* (1989) *Makromol. Chem* 190:69-82, which describes water soluble photocleavable copolymers, including hydroxypropylmethacrylamide copolymer, glycine copolymer, fluorescein copolymer and methylrhodamine copolymer; Goldmacher *et al.* (1992) *Bioconj. Chem.* 3:104-107, which describes a cross-linker and reagent that undergoes photolytic degradation upon exposure to near UV light (350 nm); and Senter *et al.* (1985) *Photochem. Photobiol* 42:231-237, which describes nitrobenzyloxycarbonyl chloride cross linking reagents that produce photocleavable linkages), thereby releasing the targeted agent upon exposure to light. Such linkers would have particular use in treating dermatological or ophthalmic conditions that can be exposed to light using fiber optics. After administration of the conjugate, the eye or skin or other body part can be exposed to light, resulting in release of the targeted moiety from the conjugate. Such photocleavable linkers are useful in connection with diagnostic

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-112-

protocols in which it is desirable to remove the targeting agent to permit rapid clearance from the body of the animal.

b) Other linkers for chemical conjugation

Other linkers, include trityl linkers, particularly, derivatized
 5 trityl groups to generate a genus of conjugates that provide for
 release of therapeutic agents at various degrees of acidity or alkalinity.
 The flexibility thus afforded by the ability to preselect the pH range at
 which the therapeutic agent is released allows selection of a linker based on the
 known physiological differences between tissues in need of delivery of a
 10 therapeutic agent (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,612,474). For example, the
 acidity of tumor tissues appears to be lower than that of normal tissues.

c) Peptide linkers

The linker moieties can be peptides. Peptide linkers can be employed in
 fusion proteins and also in chemically linked conjugates. The peptide typically
 15 has from about 2 to about 60 amino acid residues, for example from about 5 to
 about 40, or from about 10 to about 30 amino acid residues. The length
 selected depends upon factors, such as the use for which the linker is included.

Peptide linkers are advantageous when the targeting agent is
 proteinaceous. For example, the linker moiety can be a flexible spacer amino
 20 acid sequence, such as those known in single-chain antibody research.
 Examples of such known linker moieties include, but are not limited to,
 peptides, such as $(\text{Gly}_m\text{Ser})_n$ and $(\text{Ser}_m\text{Gly})_n$, in which n is 1 to 6, including 1 to
 4 and 2 to 4, and m is 1 to 6, including 1 to 4, and 2 to 4, enzyme cleavable
 linkers and others.

25 Additional linking moieties are described, for example, in Huston *et al.*,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, 1988; Whitlow, M., *et al.*, *Protein*
Engineering 6:989-995, 1993; Newton *et al.*, *Biochemistry* 35:545-553, 1996;
 A. J. Cumber *et al.*, *Bioconj. Chem.* 3:397-401, 1992; Ladurner *et al.*, *J. Mol.*
Biol. 273:330-337, 1997; and U.S. Patent. No. 4,894,443. In some
 30 embodiments, several linkers can be included in order to take advantage of
 desired properties of each linker.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-113-

3. Targeting agents

Any agent that facilitates detection, immobilization, or purification of the conjugate is contemplated for use herein. For chemical conjugates any moiety that has such properties is contemplated; for fusion proteins, the targeting agent is a protein, peptide or fragment thereof that is sufficient to effects the targeting activity. Contemplated targeting agents include those that deliver the MTSP9 polypeptide or portion thereof to selected cells and tissues. Such agents include tumor specific monoclonal antibodies and portions thereof, growth factors, such as FGF, EGF, PDGF, VEGF, cytokines, including chemokines, and other such agents.

4. Nucleic acids, plasmids and cells

Isolated nucleic acid fragments encoding fusion proteins are provided. The nucleic acid fragment that encodes the fusion protein includes: a) nucleic acid encoding a protease domain of an MTSP9 polypeptide; and b) nucleic acid encoding a protein, peptide or effective fragment thereof that facilitates: i) affinity isolation or purification of the fusion protein; ii) attachment of the fusion protein to a surface; or iii) detection of the fusion protein. Generally, the nucleic acid is DNA.

Plasmids for replication and vectors for expression that contain the above nucleic acid fragments are also provided. Cells containing the plasmids and vectors are also provided. The cells can be any suitable host including, but are not limited to, bacterial cells, yeast cells, fungal cells, plant cells, insect cell and animal cells. The nucleic acids, plasmids, and cells containing the plasmids can be prepared according to methods known in the art including any described herein.

Also provided are methods for producing the above fusion proteins. An exemplary method includes the steps of growing, for example, culturing the cells so that they proliferate, cells containing a plasmid encoding the fusion protein under conditions whereby the fusion protein is expressed by the cell, and recovering the expressed fusion protein. Methods for expressing and recovering recombinant proteins are well known in the art (*See generally, Current Protocols*

-114-

in *Molecular Biology* (1998) § 16, John Wiley & Sons, Inc.) and such methods can be used for expressing and recovering the expressed fusion proteins.

The recovered fusion proteins can be isolated or purified by methods known in the art such as centrifugation, filtration, chromatography, 5 electrophoresis, immunoprecipitation, and other such methods, or by a combination thereof (*See generally, Current Protocols in Molecular Biology* (1998) § 10, John Wiley & Sons, Inc.). Generally the recovered fusion protein is isolated or purified through affinity binding between the protein or peptide fragment of the fusion protein and an affinity binding moiety. As discussed in 10 the above sections regarding the construction of the fusion proteins, any affinity binding pairs can be constructed and used in the isolation or purification of the fusion proteins. For example, the affinity binding pairs can be protein binding sequences/protein, DNA binding sequences/DNA sequences, RNA binding sequences/RNA sequences, lipid binding sequences/lipid, polysaccharide binding 15 sequences/polysaccharide, or metal binding sequences/metal.

5. Immobilization and supports or substrates therefor

In certain embodiments, where the targeting agents are designed for linkage to surfaces, the MTSP9 polypeptide can be attached by linkage such as ionic or covalent, non-covalent or other chemical interaction, to a surface of a 20 support or matrix material. Immobilization can be effected directly or via a linker. The MTSP9 polypeptide can be immobilized on any suitable support, including, but are not limited to, silicon chips, and other supports described herein and known to those of skill in the art. A plurality of MTSP9 polypeptide or protease domains thereof can be attached to a support, such as an array (*i.e.*, 25 a pattern of two or more) of conjugates on the surface of a silicon chip or other chip for use in high throughput protocols and formats.

It is also noted that the domains of the MTSP9 polypeptide can be linked directly to the surface or via a linker without a targeting agent linked thereto. Hence chips containing arrays of the domains of the MTSP9 polypeptide.

30 The matrix material or solid supports contemplated herein are generally any of the insoluble materials known to those of skill in the art to immobilize ligands and other molecules, and are those that used in many chemical

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-115-

syntheses and separations. Such supports are used, for example, in affinity chromatography, in the immobilization of biologically active materials, and during chemical syntheses of biomolecules, including proteins, amino acids and other organic molecules and polymers. The preparation of and use of supports is well known to those of skill in this art; there are many such materials and preparations thereof known. For example, naturally-occurring support materials, such as agarose and cellulose, can be isolated from their respective sources, and processed according to known protocols, and synthetic materials can be prepared in accord with known protocols.

10 The supports are typically insoluble materials that are solid, porous, deformable, or hard, and have any required structure and geometry, including, but not limited to: beads, pellets, disks, capillaries, hollow fibers, needles, solid fibers, random shapes, thin films and membranes. Thus, the item can be fabricated from the matrix material or combined with it, such as by coating all or
15 part of the surface or impregnating particles.

Typically, when the matrix is particulate, the particles are at least about 10-2000 μm , but can be smaller or larger, depending upon the selected application. Selection of the matrices is governed, at least in part, by their physical and chemical properties, such as solubility, functional groups,
20 mechanical stability, surface area swelling propensity, hydrophobic or hydrophilic properties and intended use.

If necessary, the support matrix material can be treated to contain an appropriate reactive moiety. In some cases, the support matrix material already containing the reactive moiety can be obtained commercially. The support
25 matrix material containing the reactive moiety can thereby serve as the matrix support upon which molecules are linked. Materials containing reactive surface moieties such as amino silane linkages, hydroxyl linkages or carboxysilane linkages can be produced by well established surface chemistry techniques involving silanization reactions, or the like. Examples of these materials are
30 those having surface silicon oxide moieties, covalently linked to gamma-amino-propylsilane, and other organic moieties; N-[3-(triethoxysilyl)propyl]phthalamic acid; and bis-(2-hydroxyethyl)aminopropyltriethoxysilane. Exemplary of readily

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-116-

available materials containing amino group reactive functionalities, include, but are not limited to, para-aminophenyltriethoxysilane. Also derivatized polystyrenes and other such polymers are well known and readily available to those of skill in this art (*e.g.*, the Tentagel® Resins are available with a multitude of functional groups, and are sold by Rapp Polymere, Tubingen, Germany; see, 5 U.S. Patent No. 4,908,405 and U.S. Patent No. 5,292,814; *see, also* Butz et al., *Peptide Res.*, 7:20-23 (1994); and Kleine et al., *Immunobiol.*, 190:53-66 (1994)).

These matrix materials include any material that can act as a support 10 matrix for attachment of the molecules of interest. Such materials are known to those of skill in this art, and include those that are used as a support matrix. These materials include, but are not limited to, inorganics, natural polymers, and synthetic polymers, including, but are not limited to: cellulose, cellulose derivatives, acrylic resins, glass, silica gels, polystyrene, gelatin, polyvinyl 15 pyrrolidone, co-polymers of vinyl and acrylamide, polystyrene cross-linked with divinylbenzene and others (*see*, Merrifield, *Biochemistry*, 3:1385-1390 (1964)), polyacrylamides, latex gels, polystyrene, dextran, polyacrylamides, rubber, silicon, plastics, nitrocellulose, celluloses, natural sponges. Of particular interest herein, are highly porous glasses (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 4,244,721) and 20 others prepared by mixing a borosilicate, alcohol and water.

Synthetic supports include, but are not limited to: acrylamides, dextran-derivatives and dextran co-polymers, agarose-polyacrylamide blends, other polymers and co-polymers with various functional groups, methacrylate derivatives and co-polymers, polystyrene and polystyrene copolymers (*see, e.g.*, 25 Merrifield, *Biochemistry*, 3:1385-1390 (1964); Berg et al., in *Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap.*, Int. Symp., 1st, Epton, Roger (Ed), pp. 453-459 (1990); Berg et al., *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 20th, Jung, G. et al. (Eds), pp. 196-198 (1989); Berg et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8024-8026 (1989); Kent et al., *Isr. J. Chem.*, 17:243-247 (1979); Kent et al., *J. Org. Chem.*, 43:2845-2852 (1978); Mitchell et al., *Tetrahedron Lett.*, 42:3795-3798 (1976); U.S. Patent No. 4,507,230; U.S. Patent No. 4,006,117; 30 and U.S. Patent No. 5,389,449). Such materials include those made from

- polymers and co-polymers such as polyvinylalcohols, acrylates and acrylic acids such as polyethylene-co-acrylic acid, polyethylene-co-methacrylic acid, polyethylene-co-ethylacrylate, polyethylene-co-methyl acrylate, polypropylene-co-acrylic acid, polypropylene-co-methyl-acrylic acid, polypropylene-co-ethylacrylate,
- 5 polypropylene-co-methyl acrylate, polyethylene-co-vinyl acetate, polypropylene-co-vinyl acetate, and those containing acid anhydride groups such as polyethylene-co-maleic anhydride and polypropylene-co-maleic anhydride. Liposomes have also been used as solid supports for affinity purifications (Powell et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 33:173 (1989)).
- 10 Numerous methods have been developed for the immobilization of proteins and other biomolecules onto solid or liquid supports (*see, e.g.*, Mosbach, *Methods in Enzymology*, 44 (1976); Weetall, *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides*, (1975); Kennedy et al., *Solid Phase Biochemistry, Analytical and Synthetic Aspects*, Scouten, ed., pp. 253-391 (1983); *see, generally*, Affinity Techniques. Enzyme Purification: *Part B. Methods in Enzymology*, Vol. 34, ed. W. B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. (1974); and Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 42, ed. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. (1974)).
- 20 Among the most commonly used methods are absorption and adsorption or covalent binding to the support, either directly or via a linker, such as the numerous disulfide linkages, thioether bonds, hindered disulfide bonds, and covalent bonds between free reactive groups, such as amine and thiol groups, known to those of skill in art (*see, e.g.*, the PIERCE CATALOG,
- 25 ImmunoTechnology Catalog & Handbook, 1992-1993, which describes the preparation of and use of such reagents and provides a commercial source for such reagents; Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press (1993); *see also* DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:6909 (1993); Zuckermann et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10646 (1992); Kurth et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994); Ellman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:4708 (1994); Sucholeiki, *Tetrahedron Letts.*, 35:7307 (1994); Sun Wang, *J. Org. Chem.*, 41:3258 (1976); Padwa et al., *J. Org. Chem.*,
- 30

41:3550 (1971); and Vedejs et al., *J. Org. Chem.*, **49**:575 (1984), which describe photosensitive linkers).

To effect immobilization, a composition containing the protein or other biomolecule is contacted with a support material such as alumina, carbon, an
5 ion-exchange resin, cellulose, glass or a ceramic. Fluorocarbon polymers have been used as supports to which biomolecules have been attached by adsorption (see, U.S. Patent No. 3,843,443; Published International PCT Application WO/86 03840).

J. Prognosis and diagnosis

10 MTSP9 polypeptide proteins, domains, analogs, and derivatives thereof, and encoding nucleic acids (and sequences complementary thereto), and anti-MTSP9 polypeptide antibodies, can be used in diagnostics, particularly diagnosis of lung, head and neck, such as esophageal tumors, prostate, colon, ovary,
15 cervix, breast and pancreas cancers. Such molecules can be used in assays, such as immunoassays, to detect, prognose, diagnose, or monitor various conditions, diseases, and disorders affecting MTSP9 polypeptide expression, or monitor the treatment thereof. For purposes herein, the presence of MTSP9s in body fluids or tumor tissues are of particular interest.

In particular, such an immunoassay is carried out by a method including
20 contacting a sample derived from a patient with an anti-MTSP9 polypeptide antibody under conditions such that specific binding can occur, and detecting or measuring the amount of any specific binding by the antibody. Such binding of antibody, in tissue sections, can be used to detect aberrant MTSP9 polypeptide localization or aberrant (e.g., increased, decreased or absent) levels of MTSP9
25 polypeptide. In a specific embodiment, antibody to an MTSP9 polypeptide can be used to assay in a patient tissue or body fluid, such as serum, sample for the presence of MTSP9 polypeptide where an aberrant level of MTSP9 polypeptide is an indication of a diseased condition.

The immunoassays which can be used include but are not limited to
30 competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin

reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays and protein A immunoassays.

MTSP9 polypeptide genes and related nucleic acid sequences and
5 subsequences, including complementary sequences, also can be used in hybridization assays. MTSP9 polypeptide nucleic acid sequences, or subsequences thereof containing about at least 8 nucleotides, generally 14 or 16 or 30 or more, generally less than 1000 or up to 100, contiguous nucleotides
10 can be used as hybridization probes. Hybridization assays can be used to detect, prognose, diagnose, or monitor conditions, disorders, or disease states associated with aberrant changes in MTSP9 polypeptide expression and/or activity as described herein. In particular, such a hybridization assay is carried out by a method by contacting a sample containing nucleic acid with a nucleic acid probe capable of hybridizing to MTSP9 polypeptide encoding DNA or RNA,
15 under conditions such that hybridization can occur, and detecting or measuring any resulting hybridization.

In a specific embodiment, a method of diagnosing a disease or disorder characterized by detecting an aberrant level of an MTSP9 polypeptide in a subject is provided herein by measuring the level of the DNA, RNA, protein or
20 functional activity of the MTSP9 polypeptide in a sample derived from the subject, wherein an increase or decrease in the level of the DNA, RNA, protein or functional activity of the MTSP9 polypeptide, relative to the level of the DNA, RNA, protein or functional activity found in an analogous sample not having the disease or disorder indicates the presence of the disease or disorder in the
25 subject.

Kits for diagnostic use are also provided, that contain in one or more containers an anti-MTSP9 polypeptide antibody, and, optionally, a labeled binding partner to the antibody. Alternatively, the anti-MTSP9 polypeptide antibody can be labeled (with a detectable marker, *e.g.*, a chemiluminescent,
30 enzymatic, fluorescent, or radioactive moiety). A kit is also provided that includes in one or more containers a nucleic acid probe capable of hybridizing to the MTSP9 polypeptide-encoding nucleic acid. In a specific embodiment, a kit

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-120-

can include in one or more containers a pair of primers (*e.g.*, each in the size range of 6-30 nucleotides) that are capable of priming amplification [*e.g.*, by polymerase chain reaction (see *e.g.*, Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), ligase chain reaction (see EP 320,308) use of Q β replicase, cyclic probe reaction, or other methods known in the art under appropriate reaction conditions of at least a portion of an MTSP9 polypeptide-encoding nucleic acid. A kit can optionally further include in a container a predetermined amount of a purified MTSP9 polypeptide or nucleic acid, *e.g.*, for use as a standard or control.

10 K. **Pharmaceutical compositions and modes of administration**

1. **Components of the compositions**

Pharmaceutical compositions containing the identified compounds that modulate the activity of an MTSP9 polypeptide are provided herein. Also provided are combinations of a compound that modulates the activity of an MTSP9 polypeptide and another treatment or compound for treatment of a neoplastic disorder, such as a chemotherapeutic compound.

The MTSP9 polypeptide modulator and the anti-tumor agent can be packaged as separate compositions for administration together or sequentially or intermittently. Alternatively, they can provided as

20 a single composition for administration or as two compositions for administration as a single composition. The combinations can be packaged as kits.

a. **MTSP9 polypeptide inhibitors**

Any MTSP9 polypeptide inhibitors, including those described herein when used alone or in combination with other compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with neoplastic diseases, including undesired and/or uncontrolled angiogenesis, can be used in the present combinations.

30 In one embodiment, the MTSP9 polypeptide inhibitor is an antibody or fragment thereof that specifically reacts with an MTSP9 polypeptide or the protease domain thereof, an inhibitor of the MTSP9 polypeptide production, an

inhibitor of MTSP9 polypeptide membrane-localization, or any inhibitor of the expression of or, especially, the activity of an MTSP9 polypeptide.

b. Anti-angiogenic agents and anti-tumor agents

Any anti-angiogenic agents and anti-tumor agents, including those
5 described herein, when used alone or in combination with other compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with undesired and/or uncontrolled angiogenesis and/or tumor growth and metastasis, particularly solid neoplasms, vascular malformations and cardiovascular
10 disorders, chronic inflammatory diseases and aberrant wound repairs, circulatory disorders, crest syndromes, dermatological disorders, or ocular disorders, can be used in the combinations. Also contemplated are anti-tumor agents for use in combination with an inhibitor of an MTSP9 polypeptide.

c. Anti-tumor agents and anti-angiogenic agents

15 The compounds identified by the methods provided herein or provided herein can be used in combination with anti-tumor agents and/or anti-angiogenesis agents.

2. Formulations and route of administration

The compounds herein and agents can be formulated as pharmaceutical
20 compositions, typically for single dosage administration. The concentrations of the compounds in the formulations are effective for delivery of an amount, upon administration, that is effective for the intended treatment. Typically, the compositions are formulated for single dosage administration. To formulate a composition, the weight fraction of a compound or mixture thereof is dissolved,
25 suspended, dispersed or otherwise mixed in a selected vehicle at an effective concentration such that the treated condition is relieved or ameliorated. Pharmaceutical carriers or vehicles suitable for administration of the compounds provided herein include any such carriers known to those skilled in the art to be suitable for the particular mode of administration.

30 In addition, the compounds can be formulated as the sole pharmaceutically active ingredient in the composition or can be combined with other active ingredients. Liposomal suspensions, including tissue-targeted

liposomes, can also be suitable as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art. For example, liposome formulations can be prepared as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

5 The active compound is included in the pharmaceutically acceptable carrier in an amount sufficient to exert a therapeutically useful effect in the absence of undesirable side effects on the patient treated. The therapeutically effective concentration can be determined empirically by testing the compounds in known *in vitro* and *in vivo* systems, such as the assays provided herein.

10 The concentration of active compound in the drug composition depends on absorption, inactivation and excretion rates of the active compound, the physicochemical characteristics of the compound, the dosage schedule, and amount administered as well as other factors known to those of skill in the art.

Typically a therapeutically effective dosage is contemplated. The
15 amounts administered can be on the order of 0.001 to 1 mg/ml, including about 0.005-0.05 mg/ml and about 0.01 mg/ml, of blood volume. Pharmaceutical dosage unit forms are prepared to provide from about 1 mg to about 1000 mg, including from about 10 to about 500 mg, and including about 25-75 mg of the essential active ingredient or a combination of essential ingredients per dosage
20 unit form. The precise dosage can be empirically determined.

The active ingredient can be administered at once, or can be divided into a number of smaller doses to be administered at intervals of time. It is understood that the precise dosage and duration of treatment is a function of the disease being treated and can be determined empirically using known testing
25 protocols or by extrapolation from *in vivo* or *in vitro* test data. It is to be noted that concentrations and dosage values can also vary with the severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or
30 supervising the administration of the compositions, and that the concentration ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or use of the claimed compositions and combinations containing them.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-123-

Pharmaceutically acceptable derivatives include acids, salts, esters, hydrates, solvates and prodrug forms. The derivative is typically selected such that its pharmacokinetic properties are superior to the corresponding neutral compound.

- 5 Thus, effective concentrations or amounts of one or more of the compounds provided herein or pharmaceutically acceptable derivatives thereof are mixed with a suitable pharmaceutical carrier or vehicle for systemic, topical or local administration to form pharmaceutical compositions. Compounds are included in an amount effective for ameliorating or treating the disorder for
- 10 which treatment is contemplated. The concentration of active compound in the composition depends on absorption, inactivation, excretion rates of the active compound, the dosage schedule, amount administered, particular formulation as well as other factors known to those of skill in the art.

- Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, subcutaneous,
- 15 or topical application can include any of the following components: a sterile diluent, such as water for injection, saline solution, fixed oil, polyethylene glycol, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvent; antimicrobial agents, such as benzyl alcohol and methyl parabens; antioxidants, such as ascorbic acid and sodium bisulfite; chelating agents, such as ethylenediaminetetraacetic acid
- 20 (EDTA); buffers, such as acetates, citrates and phosphates; and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. Parenteral preparations can be enclosed in ampules, disposable syringes or single or multiple dose vials made of glass, plastic or other suitable material.

- In instances in which the compounds exhibit insufficient solubility,
- 25 methods for solubilizing compounds can be used. Such methods are known to those of skill in this art, and include, but are not limited to, using cosolvents, such as dimethylsulfoxide (DMSO), using surfactants, such as Tween®, or dissolution in aqueous sodium bicarbonate. Derivatives of the compounds, such as prodrugs of the compounds can also be used in formulating effective
- 30 pharmaceutical compositions. For ophthalmic indications, the compositions are formulated in an ophthalmically acceptable carrier. For the ophthalmic uses herein, local administration, either by topical administration or by injection are

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-124-

contemplated. Time release formulations are also desirable. Typically, the compositions are formulated for single dosage administration, so that a single dose administers an effective amount.

Upon mixing or addition of the compound with the vehicle, the resulting mixture can be a solution, suspension, emulsion or other composition. The form of the resulting mixture depends upon a number of factors, including the intended mode of administration and the solubility of the compound in the selected carrier or vehicle. If necessary, pharmaceutically acceptable salts or other derivatives of the compounds are prepared.

The compound is included in the pharmaceutically acceptable carrier in an amount sufficient to exert a therapeutically useful effect in the absence of undesirable side effects on the patient treated. It is understood that number and degree of side effects depends upon the condition for which the compounds are administered. For example, certain toxic and undesirable side effects are tolerated when treating life-threatening illnesses that would not be tolerated when treating disorders of lesser consequence.

The compounds also can be mixed with other active materials, that do not impair the desired action, or with materials that supplement the desired action known to those of skill in the art. The formulations of the compounds and agents for use herein include those suitable for oral, rectal, topical, inhalational, buccal (e.g., sublingual), parenteral (e.g., subcutaneous, intramuscular, intradermal, or intravenous), transdermal administration or any route. The most suitable route in any given case depends on the nature and severity of the condition being treated and on the nature of the particular active compound which is being used. The formulations are provided for administration to humans and animals in unit dosage forms, such as tablets, capsules, pills, powders, granules, sterile parenteral solutions or suspensions, and oral solutions or suspensions, and oil-water emulsions containing suitable quantities of the compounds or pharmaceutically acceptable derivatives thereof. The pharmaceutically therapeutically active compounds and derivatives thereof are typically formulated and administered in unit-dosage forms or multiple-dosage forms. Unit-dose forms as used herein refers to physically discrete units suitable

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-125-

for human and animal subjects and packaged individually as is known in the art. Each unit-dose contains a predetermined quantity of the therapeutically active compound sufficient to produce the desired therapeutic effect, in association with the required pharmaceutical carrier, vehicle or diluent. Examples of

5 unit-dose forms include ampoules and syringes and individually packaged tablets or capsules. Unit-dose forms can be administered in fractions or multiples thereof. A multiple-dose form is a plurality of identical unit-dosage forms packaged in a single container to be administered in segregated unit-dose form. Examples of multiple-dose forms include vials, bottles of tablets or capsules or

10 bottles of pints or gallons. Hence, multiple dose form is a multiple of unit-doses which are not segregated in packaging.

The composition can contain along with the active ingredient: a diluent such as lactose, sucrose, dicalcium phosphate, or carboxymethylcellulose; a lubricant, such as magnesium stearate, calcium stearate and talc; and a binder

15 such as starch, natural gums, such as gum acaciagelatin, glucose, molasses, polyvinylpyrrolidone, celluloses and derivatives thereof, povidone, crospovidones and other such binders known to those of skill in the art. Liquid pharmaceutically administrable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, or otherwise mixing an active compound as defined above

20 and optional pharmaceutical adjuvants in a carrier, such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, glycols, ethanol, and the like, to thereby form a solution or suspension. If desired, the pharmaceutical composition to be administered can also contain minor amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting agents, emulsifying agents, or solubilizing agents, pH buffering

25 agents and the like, for example, acetate, sodium citrate, cyclodextrine derivatives, sorbitan monolaurate, triethanolamine sodium acetate, triethanolamine oleate, and other such agents. Methods of preparing such dosage forms are known, or will be apparent, to those skilled in this art (see, *e.g.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975). The composition or formulation to be administered

30 contains a quantity of the active compound in an amount sufficient to alleviate the symptoms of the treated subject.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-126-

Dosage forms or compositions containing active ingredient in the range of 0.005% to 100% with the balance made up from non-toxic carrier can be prepared. For oral administration, the pharmaceutical compositions can take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with

- 5 pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (*e.g.*, pregelatinized maize starch, polyvinyl pyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (*e.g.*, lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (*e.g.*, magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (*e.g.*, potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents
10 (*e.g.*, sodium lauryl sulphate). The tablets can be coated by methods well-known in the art.

The pharmaceutical preparation can also be in liquid form, for example, solutions, syrups or suspensions, or can be presented as a drug product for reconstitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid

- 15 preparations can be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (*e.g.*, sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (*e.g.*, lecithin or acacia); non-aqueous vehicles (*e.g.*, almond oil, oily esters, or fractionated vegetable oils); and preservatives (*e.g.*, methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid).
20

Formulations suitable for rectal administration can be presented as unit dose suppositories. These can be prepared by admixing the active compound with one or more conventional solid carriers, for example, cocoa butter, and then shaping the resulting mixture.

- 25 Formulations suitable for topical application to the skin or to the eye generally are formulated as an ointment, cream, lotion, paste, gel, spray, aerosol and oil. Carriers which can be used include vaseline, lanoline, polyethylene glycols, alcohols, and combinations of two or more thereof. The topical formulations can further advantageously contain 0.05 to 15 percent by weight
30 of thickeners selected from among hydroxypropyl methyl cellulose, methyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, poly (alkylene glycols), poly/hydroxyalkyl, (meth)acrylates or poly(meth)acrylamides. A topical

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-127-

formulation is often applied by instillation or as an ointment into the conjunctival sac. It also can be used for irrigation or lubrication of the eye, facial sinuses, and external auditory meatus. It can also be injected into the anterior eye chamber and other places. The topical formulations in the liquid state can be
5 also present in a hydrophilic three-dimensional polymer matrix in the form of a strip, contact lens, and the like from which the active components are released.

For administration by inhalation, the compounds for use herein can be delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, *e.g.*, dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other
10 suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit can be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, *e.g.*, gelatin, for use in an inhaler or insufflator can be formulated containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as
15 lactose or starch.

Formulations suitable for buccal (sublingual) administration include, for example, lozenges containing the active compound in a flavored base, usually sucrose and acacia or tragacanth; and pastilles containing the compound in an inert base such as gelatin and glycerin or sucrose and acacia.

20 The compounds can be formulated for parenteral administration by injection, *e.g.*, by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection can be presented in unit dosage form, *e.g.*, in ampules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions can be suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and can contain formulatory
25 agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient can be in powder form for reconstitution with a suitable vehicle, *e.g.*, sterile pyrogen-free water or other solvents, before use.

Formulations suitable for transdermal administration can be presented as discrete patches adapted to remain in intimate contact with the epidermis of the
30 recipient for a prolonged period of time. Such patches suitably contain the active compound as an optionally buffered aqueous solution of, for example, 0.1 to 0.2 M concentration with respect to the active compound. Formulations

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-128-

suitable for transdermal administration can also be delivered by iontophoresis (see, e.g., *Pharmaceutical Research* 3 (6), 318 (1986)) and typically take the form of an optionally buffered aqueous solution of the active compound.

The pharmaceutical compositions can also be administered by controlled
5 release means and/or delivery devices (see, e.g., in U.S. Patent Nos. 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,610; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,566; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 and 5,733,566).

Desirable blood levels can be maintained by a continuous infusion of the
10 active agent as ascertained by plasma levels. It should be noted that the attending physician would know how to and when to terminate, interrupt or adjust therapy to lower dosage due to toxicity, or bone marrow, liver or kidney dysfunctions. Conversely, the attending physician would also know how to and when to adjust treatment to higher levels if the clinical response is not adequate
15 (precluding toxic side effects).

The efficacy and/or toxicity of the MTSP9 polypeptide inhibitor(s), alone or in combination with other agents also can be assessed by the methods known in the art (See generally, O'Reilly, *Investigational New Drugs*, 15:5-13 (1997)).

The active compounds or pharmaceutically acceptable derivatives can be
20 prepared with carriers that protect the compound against rapid elimination from the body, such as time release formulations or coatings.

Kits containing the compositions and/or the combinations with instructions for administration thereof are provided. The kit can further include a
25 needle or syringe, typically packaged in sterile form, for injecting the complex, and/or a packaged alcohol pad. Instructions are optionally included for administration of the active agent by a clinician or by the patient.

Finally, the compounds or MTSP9 polypeptides or protease domains thereof or compositions containing any of the preceding agents can be packaged
30 as articles of manufacture containing packaging material, a compound or suitable derivative thereof provided herein, which is effective for treatment of a diseases or disorders contemplated herein, within the packaging material, and a label that indicates that the compound or a suitable derivative thereof is for treating the

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-129-

diseases or disorders contemplated herein. The label can optionally include the disorders for which the therapy is warranted.

L. Methods of treatment

The compounds identified by the methods herein are used for treating or preventing neoplastic diseases in an animal, particularly a mammal, including a human, is provided herein. In one embodiment, the method includes administering to a mammal an effective amount of an inhibitor of an MTSP9 polypeptide, whereby the disease or disorder is treated or prevented.

In an embodiment, the MTSP9 polypeptide inhibitor used in the treatment or prevention is administered with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. The mammal treated can be a human. The inhibitors provided herein are those identified by the screening assays. In addition, antibodies and antisense nucleic acids or double-stranded RNA (dsRNA), such as RNAi, are contemplated.

The treatment or prevention method can further include administering an anti-angiogenic treatment or agent or anti-tumor agent simultaneously with, prior to or subsequent to the MTSP9 polypeptide inhibitor, which can be any compound identified that inhibits the activity of an MTSP9 polypeptide. Such compounds include small molecule modulators, an antibody or a fragment or derivative thereof containing a binding region thereof against the MTSP9 polypeptide, an antisense nucleic acid or double-stranded RNA (dsRNA), such as RNAi, encoding an a portion of the MTSP9 polypeptide or complementary to thereto, and a nucleic acid containing at least a portion of a gene encoding the MTSP9 polypeptide into which a heterologous nucleotide sequence has been inserted such that the heterologous sequence inactivates the biological activity of at least a portion of the gene encoding the MTSP9 polypeptide, in which the portion of the gene encoding the MTSP9 polypeptide flanks the heterologous sequence to promote homologous recombination with a genomic gene encoding the MTSP9 polypeptide. In addition, such molecules are generally less than about 1000 nt long.

-130-

1. Antisense treatment

In a specific embodiment, as described hereinabove, MTSP9 polypeptide function is reduced or inhibited by MTSP9 polypeptide antisense nucleic acids, to treat or prevent neoplastic disease. The therapeutic or prophylactic use of
 5 nucleic acids of at least six nucleotides, generally up to about 150 nucleotides, that are antisense to a gene or cDNA encoding MTSP9 polypeptide or a portion thereof is provided. An MTSP9 polypeptide "antisense" nucleic acid as used herein refers to a nucleic acid capable of hybridizing to a portion of an MTSP9 polypeptide RNA (generally mRNA) by virtue of some sequence complementarity,
 10 and generally under high stringency conditions. The antisense nucleic acid can be complementary to a coding and/or noncoding region of an MTSP9 polypeptide mRNA. Such antisense nucleic acids have utility as therapeutics that reduce or inhibit MTSP9 polypeptide function, and can be used in the treatment or prevention of disorders as described *supra*.

15 The MTSP9 polypeptide antisense nucleic acids are of at least six nucleotides and are generally oligonucleotides (ranging from 6 to about 150 nucleotides including 6 to 50 nucleotides). The antisense molecule can be complementary to all or a portion of the protease domain. For example, the oligonucleotide is at least 10 nucleotides, at least 15 nucleotides, at least 100
 20 nucleotides, or at least 125 nucleotides. The oligonucleotides can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone. The oligonucleotide can include other appending groups such as peptides, or agents facilitating transport across
 25 the cell membrane (see, *e.g.*, Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6553-6556 (1989); Lemaitre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:648-652 (1987); PCT Publication No. WO 88/09810, published December 15, 1988) or blood-brain barrier (see, *e.g.*, PCT Publication No. WO 89/10134, published April
 25, 1988), hybridization-triggered cleavage agents (see, *e.g.*, Krol et al.,
 30 *BioTechniques* 6:958-976 (1988)) or intercalating agents (see, *e.g.*, Zon, *Pharm. Res.* 5:539-549 (1988)).

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-131-

The MTSP9 polypeptide antisense nucleic acid generally is an oligonucleotide, typically single-stranded DNA or RNA or an analog thereof or mixtures thereof. For example, the oligonucleotide includes a sequence antisense to a portion of a nucleic acid that encodes a human MTSP9

5 polypeptide. The oligonucleotide can be modified at any position on its structure with substituents generally known in the art.

The MTSP9 polypeptide antisense oligonucleotide can include at least one modified base moiety which is selected from the group including, but not limited to 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 10 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 15 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, 20 uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine.

In another embodiment, the oligonucleotide includes at least one modified sugar moiety selected from the group including but not limited to arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose. The oligonucleotide can include at least 25 one modified phosphate backbone selected from a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, and a formacetal or analog thereof.

The oligonucleotide can be an α -anomeric oligonucleotide. An α -anomeric 30 oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which the strands run parallel to each other (Gautier et al., *Nucl. Acids Res.* 15:6625-6641 (1987)).

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-132-

The oligonucleotide can be conjugated to another molecule, such as, but are not limited to, a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent or a hybridization-triggered cleavage agent. The oligonucleotides can be synthesized by standard methods known in the art, *e.g.* by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples, phosphorothioate oligonucleotides can be synthesized by the method of Stein et al. (*Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988)), methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451 (1988)), etc.

In a specific embodiment, the MTSP9 polypeptide antisense oligonucleotide includes catalytic RNA or a ribozyme (see, *e.g.*, PCT International Publication WO 90/11364, published October 4, 1990; Sarver et al., *Science* 247:1222-1225 (1990)). In another embodiment, the oligonucleotide is a 2'-O-methylribonucleotide (Inoue et al., *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148 (1987)), or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue et al., *FEBS Lett.* 215:327-330 (1987)). Alternatively, the oligonucleotide can be double-stranded RNA (dsRNA) such as RNAi.

In an alternative embodiment, the MTSP9 polypeptide antisense nucleic acid is produced intracellularly by transcription from an exogenous sequence. For example, a vector can be introduced *in vivo* such that it is taken up by a cell, within which cell the vector or a portion thereof is transcribed, producing an antisense nucleic acid (RNA). Such a vector would contain a sequence encoding the MTSP9 polypeptide antisense nucleic acid. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired antisense RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art. Vectors can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in mammalian cells. Expression of the sequence encoding the MTSP9 polypeptide antisense RNA can be by any promoter known in the art to act in mammalian, including human, cells. Such promoters can be inducible or constitutive. Such promoters include but are not limited to: the SV40 early promoter region

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-133-

(Bernoist and Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto et al., *Cell* 22:787-797 (1980), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445 (1981), the regulatory sequences of the

5 metallothionein gene (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982), etc.

The antisense nucleic acids include sequence complementary to at least a portion of an RNA transcript of an MTSP9 polypeptide gene, including a human MTSP9 polypeptide gene. Absolute complementarity is not required.

The amount of MTSP9 polypeptide antisense nucleic acid that is effective

10 in the treatment or prevention of neoplastic disease depends on the nature of the disease, and can be determined empirically by standard clinical techniques. Where possible, it is desirable to determine the antisense cytotoxicity in cells *in vitro*, and then in useful animal model systems prior to testing and use in humans.

15 2. RNA interference

RNA interference (RNAi) (see, e.g. Chuang et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4985) can be employed to inhibit the expression of a gene encoding an MTSP9. Interfering RNA (RNAi) fragments, particularly double-stranded (ds) RNAi, can be used to generate loss-of-MTSP9 function. Methods

20 relating to the use of RNAi to silence genes in organisms including, mammals, C. elegans, Drosophila and plants, and humans are known (see, e.g., Fire et al. (1998) *Nature* 391:806-811; Fire (1999) *Trends Genet.* 15:358-363; Sharp (2001) *Genes Dev.* 15:485-490; Hammond, et al. (2001) *Nature Rev. Genet.* 2:110-111; Tuschl (2001) *Chem. Biochem.* 2:239-245; Hamilton et al. (1999) *Science* 286:950-952; Hammond et al. (2000) *Nature* 404:293-296; Zamore et al. (2000) *Cell* 101:25-33; Bernstein et al. (2001) *Nature* 409: 363-366; Elbashir et al. (2001) *Genes Dev.* 15:188-200; Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-498; International PCT application No. WO 01/29058; International PCT application No. WO 99/32619).

30 Double-stranded RNA (dsRNA)-expressing constructs are introduced into a host, such as an animal or plant using, a replicable vector that remains episomal or integrates into the genome. By selecting appropriate sequences,

-134-

expression of dsRNA can interfere with accumulation of endogenous mRNA encoding an MTSP9. RNAi also can be used to inhibit expression *in vitro*. Regions include at least about 21 (or 21) nucleotides that are selective (i.e. unique) for MTSP9 are used to prepare the RNAi. Smaller fragments of about 21
 5 nucleotides can be transformed directly (i.e., *in vitro* or *in vivo*) into cells; larger RNAi dsRNA molecules are generally introduced using vectors that encode them. dsRNA molecules are at least about 21 bp long or longer, such as 50, 100, 150, 200 and longer. Methods, reagents and protocols for introducing nucleic acid molecules in to cells *in vitro* and *in vivo* are known to those of skill in the
 10 art.

3. Gene Therapy

In an exemplary embodiment, nucleic acids that include a sequence of nucleotides encoding an MTSP9 polypeptide or functional domains or derivative thereof, are administered to promote MTSP9 polypeptide function, by way of
 15 gene therapy. Gene therapy refers to therapy performed by the administration of a nucleic acid to a subject. In this embodiment, the nucleic acid produces its encoded protein that mediates a therapeutic effect by promoting MTSP9 polypeptide function. Any of the methods for gene therapy available in the art can be used (see, Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu
 20 and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *An. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, *An. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993). For example, one therapeutic composition for gene therapy includes an MTSP9 polypeptide-encoding nucleic acid that is part of an
 25 expression vector that expresses an MTSP9 polypeptide or domain, fragment or chimeric protein thereof in a suitable host. In particular, such a nucleic acid has a promoter operably linked to the MTSP9 polypeptide coding region, the promoter being inducible or constitutive, and, optionally, tissue-specific. In another particular embodiment, a nucleic acid molecule is used in which the
 30 MTSP9 polypeptide coding sequences and any other desired sequences are flanked by regions that promote homologous recombination at a desired site in the genome, thus providing for intrachromosomal expression of the SP protein

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-135-

nucleic acid (Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989)).

Delivery of the nucleic acid into a patient can be either direct, in which case the patient is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid-carrying
5 vector, or indirect, in which case, cells are first transformed with the nucleic acid *in vitro*, then transplanted into the patient. These two approaches are known, respectively, as *in vivo* or *ex vivo* gene therapy.

In a specific embodiment, the nucleic acid is directly administered *in vivo*, where it is expressed to produce the encoded product. This can be
10 accomplished by any of numerous methods known in the art, *e.g.*, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, *e.g.*, by infection using a defective or attenuated retroviral or other viral vector (see U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection of naked DNA, or by use of microparticle
15 bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, encapsulation in liposomes, microparticles, or microcapsules, or by administering it in linkage to a peptide which is known to enter the nucleus, by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (see *e.g.*, Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*
20 262:4429-4432 (1987)) (which can be used to target cell types specifically expressing the receptors), etc. In another embodiment, a nucleic acid-ligand complex can be formed in which the ligand is a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted *in vivo* for cell specific
25 uptake and expression, by targeting a specific receptor (see, *e.g.*, PCT Publications WO 92/06180 dated April 16, 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 dated December 23, 1992 (Wilson et al.); WO92/20316 dated November 26, 1992 (Findeis et al.); WO93/14188 dated July 22, 1993 (Clarke et al.), WO 93/20221 dated October 14, 1993 (Young)). Alternatively, the nucleic acid can
30 be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination (Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989)).

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-136-

In a specific embodiment, a viral vector that contains the MTSP9 polypeptide nucleic acid is used. For example, a retroviral vector can be used (see Miller et al., *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). These retroviral vectors have been modified to delete retroviral sequences that are not necessary for packaging of the viral genome and integration into host cell DNA. The MTSP9 polypeptide nucleic acid to be used in gene therapy is cloned into the vector, which facilitates delivery of the gene into a patient. More detail about retroviral vectors can be found in Boesen et al., *Biotherapy* 6:291-302 (1994), which describes the use of a retroviral vector to deliver the *mdr1* gene to hematopoietic stem cells in order to make the stem cells more resistant to chemotherapy. Other references illustrating the use of retroviral vectors in gene therapy are: Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); and Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993).

Adenoviruses are other viral vectors that can be used in gene therapy. Adenoviruses are especially attractive vehicles for delivering genes to respiratory epithelia. Adenoviruses naturally infect respiratory epithelia where they cause a mild disease. Other targets for adenovirus-based delivery systems are liver, the central nervous system, endothelial cells, and muscle. Adenoviruses have the advantage of being capable of infecting non-dividing cells. Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) present a review of adenovirus-based gene therapy. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demonstrated the use of adenovirus vectors to transfer genes to the respiratory epithelia of rhesus monkeys. Other instances of the use of adenoviruses in gene therapy can be found in Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); and Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993).

Adeno-associated virus (AAV) has also been proposed for use in gene therapy (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993)).

Another approach to gene therapy involves transferring a gene to cells in tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-137-

phosphate mediated transfection, or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells are then placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells are then delivered to a patient.

- 5 In this embodiment, the nucleic acid is introduced into a cell prior to administration *in vivo* of the resulting recombinant cell. Such introduction can be carried out by any method known in the art, including but not limited to transfection, electroporation, microinjection, infection with a viral or bacteriophage vector containing the nucleic acid sequences, cell fusion,
- 10 chromosome-mediated gene transfer, microcell-mediated gene transfer, spheroplast fusion, etc. Numerous techniques are known in the art for the introduction of foreign genes into cells (see *e.g.*, Loeffler and Behr, *Meth. Enzymol.* 217:599-618 (1993); Cohen et al., *Meth. Enzymol.* 217:618-644 (1993); Cline, *Pharmac. Ther.* 29:69-92 (1985)) and can be used, provided that
- 15 the necessary developmental and physiological functions of the recipient cells are not disrupted. The technique should provide for the stable transfer of the nucleic acid to the cell, so that the nucleic acid is expressible by the cell and generally heritable and expressible by its cell progeny.

- The resulting recombinant cells can be delivered to a patient by various
- 20 methods known in the art. In an embodiment, epithelial cells are injected, *e.g.*, subcutaneously. In another embodiment, recombinant skin cells can be applied as a skin graft onto the patient. Recombinant blood cells (*e.g.*, hematopoietic stem or progenitor cells) can be administered intravenously. The amount of cells envisioned for use depends on the desired effect, patient state, etc., and can be
- 25 determined by one skilled in the art.

- Cells into which a nucleic acid can be introduced for purposes of gene therapy encompass any desired, available cell type, and include but are not limited to epithelial cells, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, muscle cells, hepatocytes; blood cells such as T lymphocytes, B lymphocytes,
- 30 monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, megakaryocytes, granulocytes; various stem or progenitor cells, in particular hematopoietic stem

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-138-

or progenitor cells, *e.g.*, such as stem cells obtained from bone marrow, umbilical cord blood, peripheral blood, fetal liver, and other sources thereof.

For example, a cell used for gene therapy is autologous to the patient. In an embodiment in which recombinant cells are used in gene therapy, an MTSP9
 5 polypeptide nucleic acid is introduced into the cells such that it is expressible by the cells or their progeny, and the recombinant cells are then administered *in vivo* for therapeutic effect. In a specific embodiment, stem or progenitor cells are used. Any stem and/or progenitor cells which can be isolated and maintained *in vitro* can potentially be used in accordance with this embodiment.
 10 Such stem cells include but are not limited to hematopoietic stem cells (HSC), stem cells of epithelial tissues such as the skin and the lining of the gut, embryonic heart muscle cells, liver stem cells (PCT Publication WO 94/08598, dated April 28, 1994), and neural stem cells (Stemple and Anderson, *Cell* 71:973-985 (1992)).

15 Epithelial stem cells (ESCs) or keratinocytes can be obtained from tissues such as the skin and the lining of the gut by known procedures (Rheinwald, *Meth. Cell Bio.* 21A:229 (1980)). In stratified epithelial tissue such as the skin, renewal occurs by mitosis of stem cells within the germinal layer, the layer closest to the basal lamina. Stem cells within the lining of the gut provide for a
 20 rapid renewal rate of this tissue. ESCs or keratinocytes obtained from the skin or lining of the gut of a patient or donor can be grown in tissue culture (Rheinwald, *Meth. Cell Bio.* 21A:229 (1980); Pittelkow and Scott, *Cano Clinic Proc.* 61:771 (1986)). If the ESCs are provided by a donor, a method for suppression of host versus graft reactivity (*e.g.*, irradiation, drug or antibody
 25 administration to promote moderate immunosuppression) also can be used.

With respect to hematopoietic stem cells (HSC), any technique which provides for the isolation, propagation, and maintenance *in vitro* of HSC can be used in this embodiment. Techniques by which this can be accomplished include (a) the isolation and establishment of HSC cultures from bone marrow
 30 cells isolated from the future host, or a donor, or (b) the use of previously established long-term HSC cultures, which can be allogeneic or xenogeneic. Non-autologous HSC generally are used with a method of suppressing

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-139-

transplantation immune reactions of the future host/patient. In a particular embodiment, human bone marrow cells can be obtained from the posterior iliac crest by needle aspiration (see, *e.g.*, Kodo et al., *J. Clin. Invest.* 73:1377-1384 (1984)). For example, the HSCs can be made highly enriched or in substantially pure form. This enrichment can be accomplished before, during, or after long-term culturing, and can be done by any techniques known in the art. Long-term cultures of bone marrow cells can be established and maintained by using, for example, modified Dexter cell culture techniques (Dexter et al., *J. Cell Physiol.* 91:335 (1977) or Witlock-Witte culture techniques (Witlock and Witte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3608-3612 (1982)).

In a specific embodiment, the nucleic acid to be introduced for purposes of gene therapy includes an inducible promoter operably linked to the coding region, such that expression of the nucleic acid is controllable by controlling the presence or absence of the appropriate inducer of transcription.

15 3. Prodrugs

A method for treating tumors is provided. The method is practiced by administering a prodrug that is cleaved at a specific site by an MTSP9 to release an active drug or precursor that can be converted to active drug *in vivo*. Upon contact with a cell that expresses MTSP9 activity, the prodrug is converted into an active drug. The prodrug can be a conjugate that contains the active agent, such as an anti-tumor drug, such as a cytotoxic agent, or other therapeutic agent (TA), linked to a substrate for the targeted MTSP9, such that the drug or agent is inactive or unable to enter a cell, in the conjugate, but is activated upon cleavage. The prodrug, for example, can contain an oligopeptide, typically a relatively short, less than about 10 amino acids peptide, that is proteolytically cleaved by the targeted MTSP9. Cytotoxic agents, include, but are not limited to, alkylating agents, antiproliferative agents and tubulin binding agents. Others include, vinca drugs, mitomycins, bleomycins and taxanes.

-140-

M. Animal models

Transgenic animal models and animals, such as rodents, including mice and rats, cows, chickens, pigs, goats, sheep, monkeys, including gorillas, and other primates, are provided herein. In particular, transgenic non-human animals
5 that contain heterologous nucleic acid encoding an MTSP9 polypeptide or a transgenic animal in which expression of the polypeptide has been altered, such as by replacing or modifying the promoter region or other regulatory region of the endogenous gene are provided. Such an animal can be produced by promoting recombination between endogenous nucleic acid and an exogenous
10 MTSP9 gene that could be over-expressed or mis-expressed, such as by expression under a strong promoter, via homologous or other recombination event.

Transgenic animals can be produced by introducing the nucleic acid using any know method of delivery, including, but not limited to, microinjection,
15 lipofection and other modes of gene delivery into a germline cell or somatic cells, such as an embryonic stem cell. Typically the nucleic acid is introduced into a cell, such as an embryonic stem cell (ES), followed by injecting the ES cells into a blastocyst, and implanting the blastocyst into a foster mother, which is followed by the birth of a transgenic animal. Generally introduction of a
20 heterologous nucleic acid molecule into a chromosome of the animal occurs by a recombination between the heterologous MTSP9-encoding nucleic acid and endogenous nucleic acid. The heterologous nucleic acid can be targeted to a specific chromosome. In some instances, knockout animals can be produced. Such an animal can be initially produced by promoting homologous
25 recombination between an MTSP9 polypeptide gene in its chromosome and an exogenous MTSP9 polypeptide gene that has been rendered biologically inactive (typically by insertion of a heterologous sequence, *e.g.*, an antibiotic resistance gene). In one embodiment, this homologous recombination is performed by transforming embryo-derived stem (ES) cells with a vector containing the
30 insertionally inactivated MTSP9 polypeptide gene, such that homologous recombination occurs, followed by injecting the ES cells into a blastocyst, and implanting the blastocyst into a foster mother, followed by the birth of the

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-141-

chimeric animal ("knockout animal") in which an MTSP9 polypeptide gene has been inactivated (see Capecchi, *Science* **244**:1288-1292 (1989)). The chimeric animal can be bred to produce homozygous knockout animals, which can then be used to produce additional knockout animals. Knockout animals include, but
5 are not limited to, mice, hamsters, sheep, pigs, cattle, and other non-human mammals. For example, a knockout mouse is produced. The resulting animals can serve as models of specific diseases, such as cancers, that exhibit under-expression of an MTSP9 polypeptide. Such knockout animals can be used as animal models of such diseases *e.g.*, to screen for or test molecules for the
10 ability to treat or prevent such diseases or disorders.

Other types of transgenic animals also can be produced, including those that over-express the MTSP9 polypeptide. Such animals include "knock-in" animals that are animals in which the normal gene is replaced by a variant, such a mutant, an over-expressed form, or other form. For example, one species',
15 such as a rodent's endogenous gene can be replaced by the gene from another species, such as from a human. Animals also can be produced by non-homologous recombination into other sites in a chromosome; including animals that have a plurality of integration events.

After production of the first generation transgenic animal, a chimeric
20 animal can be bred to produce additional animals with over-expressed or mis-expressed MTSP9 polypeptides. Such animals include, but are not limited to, mice, hamsters, sheep, pigs, cattle and other non-human mammals. The resulting animals can serve as models of specific diseases, such as cancers, that are exhibit over-expression or mis-expression of an MTSP9 polypeptide. Such
25 animals can be used as animal models of such diseases *e.g.*, to screen for or test molecules for the ability to treat or prevent such diseases or disorders. In a specific embodiment, a mouse with over-expressed or mis-expressed MTSP9 polypeptide is produced.

30 The following examples are included for illustrative purposes only and are not intended to limit the scope of the invention.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-142-

EXAMPLE 1**Identification of MTSP9**

The protein sequence of the protease domain of matrilysin (MTSP1; accession number AF118224) was used to search the human HTGS (High
 5 Throughput Genomic Sequence) database using the tblastn algorithm. This search and alignment algorithm compares a protein query sequence against a nucleotide sequence database dynamically translated in all six reading frames (both strands). Several potential serine proteases were identified, including one designated herein as MTSP9.

- 10 The translated sequence of MTSP9 has 36% identity to matrilysin. MTSP9 appears to be localized in chromosome 15 (AC012571 clone). A search of sequences deposited in GenBank showed that no identical sequence has been deposited. Further search of the human EST database showed one EST clone (called HSU77054; GenBank accession number U77054) that matches almost
 15 completely a short segment of MTSP9 sequence (nt 631 to nt 754 of SEQ ID No. 5, or the corresponding sequence in the full length clone nt. 1162-1279 of SEQ ID No. 17) except for 3 nucleotide mismatches.

Identification of tissue source for cloning of MTSP9

- Using the nucleotide sequence of MTSP9 derived from the genomic
 20 sequence, two gene specific oligonucleotide primers were designed. The sequence for the 5' end primer is 5'-GGCAAGCTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAG-3' (SEQ ID No. 7) and that of the 3' end primer is 5'-AATGAGATACCACGTATCTTTCAGATCCCTTG-3' (SEQ ID No. 8). These primers were used to screen a panel of 8 cDNA libraries
 25 derived normal human tissues (Human Multiple Tissue cDNA Panel I; Clontech, Palo Alto, CA; catalog no. K1420-1). A band (~700 bp) was detected in human pancreas, and subsequent sequence analysis showed that the nucleotide sequence of this DNA fragment matched that of the genomic MTSP9 exon sequences.

30 Gene expression profile of MTSP9 in normal, tumor tissues and cell lines

To obtain a gene expression profile of the MTSP9 transcript, the MTSP9 cDNA fragment obtained from human pancreas was used to probe a dot blot

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-143-

composed of RNA extracted from 76 different human tissues (Human Multiple Tissue Expression (MTE) Array; Clontech, Palo Alto, CA; catalog no. 7775-1).

The results of this analysis indicate that MTSP9 is highly expressed in the esophagus and expressed at a low level in many other tissues. The MTSP9

5 transcript is found in kidney (adult and fetal), spleen (adult and fetal), placenta, liver (adult and fetal), thymus, peripheral blood leukocyte, lung (adult and fetal), pancreas, lymph node, bone marrow, trachea, uterus, prostate, esophagus, testes, ovary and the gland organs (mammary, adrenal, thyroid, pituitary and salivary). MTSP9 is also expressed in tumor esophagus tissues, in a lung
10 carcinoma (A549 cell line) and, at a low level, in a colorectal carcinoma (SW480), lymphoma (Raji and Daudi), a cervical carcinoma (HeLaS3) and leukemia (HL-60, K-562 and MOLT-4) cell lines.

PCR amplification of cDNA encoding full-length protease domain of MTSP9

To obtain the cDNA fragment encoding the protease domain of MTSP9,
15 an end-to-end PCR amplification using gene-specific primers and the cDNA library from human esophagus was used. The two primers used were:
5'-CGAGTTGTTCCATTAAACGTCAACAGAATAGC-3' (SEQ ID No. 9) for the 5' end and 5'-GCATACAGCTTCTTTGTTAACTTTATCGTG-3' (SEQ ID No. 10) for the 3' end. The sequences for both primers were derived from the genomic
20 sequence of MTSP9. The 5' primer contained the sequence that encodes a region immediately upstream of the start of the MTSP9 protease domain (RVVPLNVNRIA; SEQ ID NO. 12). The 3' primer corresponds to the sequence immediately after the presumed stop codon. A ~750-bp fragment was amplified from the human esophagus cDNA library. The PCR product was isolated and
25 purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA; catalog no. 28704). The MTSP9 PCR product was used to amplify the cDNA fragment containing the appropriate restriction sites for subcloning into the Pichia vector, pPIC9K. The gene-specific primers used were
5'-TCTCTCGAGAAAAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCACCCAAG-3' (SEQ ID
30 No. 13) at the 5' end and
5'-ATACCGGCGCATTAGATGCCTGTTTTGAAGCAATC-3' (SEQ ID No. 14) at the 3' end. The 5' end primer contained an XhoI site (underlined) immediately

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-144-

upstream of the Pichia protease cleavage site and part of the MTSP9 protease domain (KRIASGV/APK; SEQ ID No. 15), while the 3' end primer contained a NotI site (underlined) immediately downstream of the stop codon (in bold).

Cloning of full-length cDNA of MTSP9 by RACE

- 5 RACE-ready cDNA libraries were prepared from both normal and tumor human esophagus poly A⁺ RNAs using SMART-RACE cDNA amplification kit (Clontech; catalog no. K1811-1) and First Choice RLM-RACE kit (Ambion, Austin, TX; catalog no. 1700). For 5'-RACE reaction, an anti-sense gene-specific primer
- 10 (5'- AATGAGATACCAAGTATCTTTCAGATCCCTTG-3' SEQ ID No. 19) together with the sense primer hybridizing to the adapter present at the 5' ends of the cDNAs was used. A band (~1.3 kbp) was amplified and identified by Southern analysis against a probe consisting of the protease domain of MTSP9. The 3'-RACE reaction was done in a similar fashion except that the sense
- 15 gene-specific primer used was 5'-ATGAGAAGTACCGCTCTGCAGCAAGAGAG-3' (SEQ ID No. 20). A band (~0.8 kbp) was amplified and isolated from agarose gel. The two RACE products were separately subcloned into E. coli vectors using TA cloning (TOPO TA cloning kit; Invitrogen, Carlsbad, CA; catalog no. K4500-01). After
- 20 transformation, plasmid DNAs from representative clones were isolated, purified and digested with EcoRI to check for the presence of inserts. The plasmid DNAs were sequenced initially with M13 forward and reverse primers, then by gene-specific primers spanning the whole insert in both directions.

Serine protease domain of MTSP9 and homology to other proteases

- 25 Sequence analysis of the translated coding region of MTSP9 showed the presence of a transmembrane domain at the N terminus and a trypsin-like serine protease domain at the C terminus. In between these domains is a stretch of protein sequence (149 amino acid residues long) with no known discernible domain, and which shares 20% identity with the same stretch of protein
- 30 sequence in endothelase 1. Overall, the full-length protein sequence of MTSP9 shares 42% identity with human endothelase 1 (DESC1; Genbank accession number AF064819) and 40% identity with another type II membrane type serine

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-145-

protease, human airway trypsin-like serine protease (Genbank accession number NP004253). Analysis of the MTSP9 protease domain sequence indicated that it is a trypsin-like serine protease domain characterized by the presence of a protease activation cleavage site at the beginning of the domain and the catalytic triad residues (histidine, aspartate and serine) in 3 highly-conserved regions of the catalytic domain. Alignment of the protease domain sequence showed 56% identity with that of endothelase 1 and 48% identity with the human airway trypsin-like protease domain.

Sequence analysis

MTSP9 cDNA and protein sequences were analyzed using MacVector (version 6.5; Oxford Molecular Ltd., Madison, WI). The cDNA encoding the protease domain of MTSP9 is 699 bp long which translates to a 232-amino acid protein. The nucleotide sequence of the protease domain and the translated protein sequence of MTSP9 are as follows (see SEQ ID Nos. 5, 6 and 16):

MTSP9-cDNA containing protease domain sequence Range: 1 to 777 (protease encoding domain 31-729)

```

10      10      20      30      40      50      60
    AAACGAGTGTTCATTAAACGTCACAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCAACCAAGGCG
20      70      80      90     100     110     120
    TTGCTCAACAAGTAATTTGCAGTTGTCTTATCGTAGACCTCAGTAACGTGGGTCCGC
    GCCTGGCCTTGGCAAGCTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAGTGTGGGCCACCTTG
    CGGACCGGAACCGTTCCGAGGGAAGTCTTACTATTGTAGGTAGTCAACACCCGGTGGAAC
25     130     140     150     160     170     180
    ATTAGTAACACATGGCTTGTCACTGCAGCACACTGCTTCCAGAAATATAAAATCCACAT
    TAATCAITGTGTACCGAACAGTGAAGTCTGTGACGAAGTCTTTCATATTTTAGGTGTA
    CAATGGACTGTTAGTTTGGAAACAAAATCAACCCCTCCCTTAATGAAAGGAATGTCAGA
    GTTACCTGACAAATCAAAACCTTGTGTTTGTAGTTGGAGGGAATTACTTTTCTTACAGTCT
30     250     260     270     280     290     300
    AGATTTATTATCCATGACAGTACCGCTCTCCAGCAAGACAGTACGACATTGCTGTGTG
    TCTAAATATAGTACTCTTCATGGCGAGAGTCCGTTCTCTATGCTGTAAACGACACAC
    CAGGTCTCTTCCAGAGTCACCTTTTCGGATGACATACGCCGGATTTGTTTGGCAGAGCC
35     310     320     330     340     350     360
    GTCCAGAGAAGGTCTCAGTGGAAAAGCCTACTGTATGCGGCCCTAAACAAACGGTCTTCGG
    TCTGCTCCTTCCAACCAAAITTTGACTGTCCACATCACAGGATTTGGAGCACTTTACTAT
    AGACGTAGGAAGGTGTTGTTTAACTGACAGGTGTAGTGTCTTAACCTCTGTGAATGATA
40     430     440     450     460     470     480
    GGTGGGGAATCCCAAAATGATCTCCGAGAAGCCAGAGTGAATAATCATAAGTGACGATGTC
    CCACCCCTTAGGGTTTACTAGAGGCTCTTCGGTCTCACTTTTAGTATTCACTGCTACAG
    TGCAAGCAACCACAGGTGATGGCAATGATATAAAACCTGGAAATGTTCTGTGCCGATAT
    ACGTTCGTTGGTCCACATACCGTTACTATATTTTGGACCTTACAGACACGGCCTATA
45     550     560     570     580     590     600
    ATGGAAGCAATTTATGATGCCCTGCAGGGGTGATTTCTGGGGACCTTTAGTCAACAGGGAT
    TACCTTCCTTAAATACTACGGACGTCCCACTAAGACCCCTCGAAATCAGTGTTCCTTA
    CTGAAGATACGTGGTATCTCATTTGGAATTGTAAGCTGGGGAGATACTGTGGTCAAAAG

```

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-146-

GACTTTCTAIGCACCATAGAGTAACCTTAACATTGACCCCTCTATTGACACCAGTTTTC
670 680 690 700 710 720
GACAAGCCTGGAGTCTACACACAAGTGACTTATTACCGAAACTGGATTGCTTCAAAAACA
CTGTTGGACCTCAGATGTGTGTTCACTGAATAATGGCTTGACCTAACGAAGTTTTGT
730 740 750 760 770
5 GGCATCTAATTACAGATAAAGTTAAACAAAGAAAGCTGTATGCAGGTCTATATATGC
CCGTAGATTAAGTGTCTATTTCATTTGTTTCTTCGACATACGTCCAGTATATACG

10 MISP9-protease domain cDNA & protein sequence Range: 31 to 729

10 20 30 40 50 60
AAACGAGTTGTTCCATTAAACGCTCAACAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCAACCCAAAGGG
15 TTGCTCAACAGGTAAATTGACGTTGTCTTATCGTAGACCTCAGTAACGTGGGTCCGC
K R V V P L N V N R I A S G V I A P K A

70 80 90 100 110 120
GCCTGGCCTTGGCAAGCTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAGTGTGGGGCCACCTTG
20 CGGACCGGAACCGTTGGAAGGGAAGTCATACTATTGTAGTAGTCACACCCCGGTGGAAC
A W F W Q A S L Q Y D N I H Q C G A T L

130 140 150 160 170 180
ATTAGTAACACATGGCTTGTCACTGCAGCACACTGCTTCCAGAAGTATAAAAATCCACAT
25 TAATCATTTGTACCGAACAGTGACGTGCTGTGACGAAGTCTTCATATTTTAGGTGTA
I S N T W L V T A A H C F Q K Y K N P H

190 200 210 220 230 240
CAATGGACTGTAGTTTTGGACAAAATCAACCTCCCTTAAAGAAAAGAAATGTGAGA
30 GTTACCTGACRATCAAAACCTTGTTTTAGTTGGAGGGAATTACTTTCTTTACAGTCT
Q W T V S F G T K I N P P L M K R N V R

250 260 270 280 290 300
AGATTTATATCCATGAGAAGTACCGCTCTGCAGCAAGAGAGTACGACATTGCTGTTGTG
35 TCTAAATAATAGGTACTCTTCATGGGAGAGCTGTTCTCTCATGCTGTAAACGACACAC
R F I I H E K Y R S A A R E Y D I A V V

310 320 330 340 350 360
CAGGTCCTTCCAGAGTCACCTTTTCGGATGACATACGCCGGATTGTTTGGCCAGAAGCC
40 GTCCAGAGAAGGTCTCAGTGGAAAAGCTACTGTATGGGCTTAAACAAACGCTCTTCGG
Q V S S R V T F S D D I R R I C L P E A

370 380 390 400 410 420
TCTGCATCCTTCCAAACCAATTGACTGTCCACATCAGAGATTGGAGCACTTTACTAT
45 AGACGTAGGAAGGTGGTTTAAACTGACAGGTGTAGTGTCTTAAACCTCGTGAATGATA
S A S F Q P N L T V H I T G F G A L Y Y

430 440 450 460 470 480
GGTGGGGAATCCCAAAATGATCTCCGAGAGCCAGAGTGAAAATCATAAGTGACCAATGTC
50 CCACCCCTTAGGGTTTACTAGAGGCTCTTCGGTCTCACTTTTAGTATTCACTGTACAG
G G E S Q N D L R E A R V K I I S D D V

490 500 510 520 530 540
TGCAAGCAACACAGGTGTATGGCAATGATATAAAACCTGGAATGTTCTGTGCCGATAT
55 ACGTTCGTGGTGTCCACATACCGTTACTATATTTGGACCTTACAAGACACGGCTTATA
C K Q P Q V Y G N D I K P G M F C A G Y

550 560 570 580 590 600
ATGGAAGGAATTTATGATGCTGCAGGGGTGATTCGGGGGACCTTTAGTCACAAGGAT
60 TACCTTCTTAATACTACGAGCTCCCACTAAGACCCCTTGAAGATCACTGTTCCTTA
M E G I Y D A C R G D S G G P L V T R D

610 620 630 640 650 660

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-147-

```

CTGAAAGATACGTGGTATCTCATTGGAAATTGTAAGCTGGGGAGATAACTGTGGTCAAAAG
GACTTTCTATGCACCATAGAGTAACCTTAACATTGACCCCTCTATTGACACCGATTTC
  L  K  D  T  W  Y  L  I  G  I  V  S  W  G  D  N  C  G  Q  K
5
      670      680      690      700      710      720
GACAAGCCTGGAGTCTACACACAAGTGACTTAATTACCGAACTGGATTGCTTCAAAAACA
CTGTTCCGACCTCAGATGTGTGTTCACTGAATAATGGCTTTGACCTAACGAAGTTTTGT
  D  K  P  G  V  Y  T  Q  V  T  Y  Y  R  N  W  I  A  S  K  T
10
GGCATCTAA
CGTAGATT
  G  I  *

```

MTSP9 cDNA and protein sequences were analyzed using MacVector

15 (version 6.5; Oxford Molecular Ltd., Madison, WI). The full-length encoding clone is 1,422 bp long, with a coding region of 1,257 bp long. The translated protein sequence is 418 amino acid residues long. The DNA encoding the protease domain of MTSP9 is 699 bp long which translate to a 232-amino acid protein.

20 MTSP9 full-length cDNA sequence

Sequence Range: 1 to 1422

```

      10      20      30      40      50      60
GGCGAGCTGGAGGACGAATCTCCGGCAGCAATTCATTACGACAAATGAATGCTGCCGGAT
25 CCGCTCGACCTTCCTGCTTAGAGGCCGTCGTAAGTAATGCTGTTTACTTACGACGGCTTA
      70      80      90      100     110     120
TAGAAAGTTGAGTTCACTGGGTGCAGACCTGCCAAGATCATATTCTTCTCCTGTACATGA
30 ATCTTTCAACTCAAGTCACCCAGTCCTGGACGTTCTAGTATAAGAAGGAGGACATGTACT
      130     140     150     160     170     180
TGTATCGGACAGTAGGATTGGCACCCGAGCAGAAATCTGAAGCCATGGATGATTGCCG
ACATAGCCTGTCTATCCTTAACCGTGGGCTTCGTCCTTAGACTTCGCTACCTACTAACGGC
35      190     200     210     220     230     240
TTCTCATTTGTGTTGTCCCTGACAGTGGTGGCAGTGCACCATAGGTCTCTGGTTCACTTCC
AAGAGTAACCAACAGGGACTGTACCCACCGTCACCTGGTATCCAGAGGACCAAGTGAAGG
      250     260     270     280     290     300
TAGTATTTGACCAAAAAAGGAGTACTATCATGGCTCCTTTAAATTTTAGATCCACAAA
40 ATCATAAACCTGGTTTTTTTCCTCATGATAGTACCGAGGAAATTTAAATCTAGTGTTTT
      310     320     330     340     350     360
TCAATACCAATTTCCGACAAAGCAACATATCAACTTAAGGACTTACGAGAGACGACCG
45 AGTTATTTGTAAGCCTGTTTCGTTGTGTATAGTTGAATTCCTGAATGCTCTCTGCTGGC
      370     380     390     400     410     420
AAAAATTGGTGGATGAGATATTTATAGATTACGCTGGAAGAAAATTTATATCAAGAAC
50 TTTTAACCACTACTCTATAAATATCTAAGTCGGACCTTCCTTTTAATATAGTTCTTGG
      430     440     450     460     470     480
AAGTAGTCGACTGACTCCAGAGGAGATGGTGTGAAGTAGAATGTCNTTATGGTGTCC
TTCTATCAGTCTGACTGAGGTCTCTCTTCCACACTTTTCATCTACAGTAATCCACAGG
55      490     500     510     520     530     540
AGTTCCCTCTACTGAACAAAGGGCAGTAAGAGAGAAGAAAATCCAAAGCATCTTAAATC

```

TCACGGGAGATGACTGTTTCCCGCTCATCTCTCTCTCTTTTAGGTTTCGTAGAATTAG

550 560 570 580 590 600

AGAAGATTAAGGAATTTAAGAGCCTTCGCCAATAATAGCTCATCATGTTCAAGTTAATGCAAT

5 TCTTCTCATTTCTTAAATTCGCGAACGGTATTATTAGGAGATAGTCAAGTTCAAATACGTTT

610 620 630 640 650 660

TGAGCTCATCAACGAGGAGTTAACTGTGTCGAACGAGTTTGGTGAATACGAGTTGTTCCAT

10 ACTCGAGTAGTTGCCCTCAATTGACAGGTTGTGTTCCACCAAGTTTGTCTCAACAGGTA

670 680 690 700 710 720

TAAACGCTCAACGAATAGCATCTGGAGTATGCTGCCACCAGGCGCTGGCCTTTGGCCAAAG

ATTTCGAGTTGCTTATCTGTAGCATCTCAGTAACTGGGTGTCGCGCGAGCCGAAACCTTCT

730 740 750 760 770 780

CTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATGAGTGTGGGGCCACCTTGATAGTAAACATATGGC

15 GAAGGAGAGTCATACATCTATGTAGTGTACACCCCGGTGGAACTAATCATCTGTATACCG

790 800 810 820 830 840

TTGTCACTGCAGCACATCTCTCCGAAGTATAAAATTCACATCAATCGACTGTAGTT

20 AACGTAAGTCGTGTGACGAAGAGTCTTCTATATTITTAGTGTAGTTACCTGACATCAA

850 860 870 880 890 900

TTGGAAACAAAATCAACCTCCCTTCTTGAAGAAAGAAATGTCAGAGAAGTTATTAATCCATG

25 AACCTTTTGTAGTTGGGAGGAAATCACTTTCTTTTACAGTCTCTTAAATTAAGGTAC

910 920 930 940 950 960

AGAAGTACCGCTCTGCAGCAGAGAGATGCACAGATTCGTGTTGTGCAGGTTCTCTCCAGAG

30 TCTTCATGGCGGAGAGCTGTTCTCTCATGCTGTAAAGCAACACGCTCCAGAGAAGGTCTC

970 980 990 1000 1010 1020

TCACCTTTTCGGATGACATACGCGGATTTGTTGGCAAGAGCTCTGCATCTTCCACAG

35 AGTGGAAAGAGCTACTGTATGCGGCTCATCAACACGGCTCTCGAGAGCTATGGAAGGTTG

1030 1040 1050 1060 1070 1080

CAAAATTTGACTGTCCACATCAGAGATTTGGAGCACTTTACTATAGTGGGGGAATCCCAAA

40 GTTTAAACTGACAGTGAGTGTAGTGTCTTAAACCTGTGAATATGACACCCCTTAGGTTPT

1090 1100 1110 1120 1130 1140

ATGATCTCGAGAGCGCAGAGTGAATATCATATGACAGATGTCTGACAGCAACCAAGAG

45 TACTAGAGGCTCTTGGTCTCACTTTTAGTATTCACTGTCACAGAGCTTGGTGTGCTCC

1150 1160 1170 1180 1190 1200

TGTTATGCGCATGATATAAAACCTGGATTTCTGTGCGGAGATATAGGAAGAAATTTATG

ACATACCGTTACTATATTATTGGACCTTACAAGACAGCGGCTATATACCTCTCTTAATAC

1210 1220 1230 1240 1250 1260

ATGCCCTGCAGGCGTGAITTTGTGGGGGACCTTTAGTCAACAGGAGCTTGAAGATACGTGTT

50 TAGCGAGCTCCCACTAAGACCGCTGGAATCAGTGTTTCCCTAGACCTTCTATGACCA

1270 1280 1290 1300 1310 1320

ATTCCTAGAAATTTGAACATCCGCTTAACCTGTGTGTCAAAAGAGCAAGCCTGTGAGTCT

1330 1340 1350 1360 1370 1380

ACACAGATGCTGACTTATTCCGAAACCTGAGTGTCTTCAAAACAGGCACTCTAATTCAAA

55 TGTGTGTTTCACTGAATATGGCTTGACTATACCAAGGTTTGTGCTGATAGTTAAGTGTTT

1390 1400 1410 1420

TTAAAGTTACAAACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

60 ATTTTCTAAATTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-149-

MTSP9 full-length coding sequence
Sequence Range: 1 to 1257

```

5      10      20      30      40      50      60
      ATGATGTATCGACAGTAGGATTTGGCACCCGAAGCAGAAATCTGAAGCCATGGATGATT
      TACTACATAGCCTGTCATCCTAAACCGTGGGCTTCGTCTTTAGACTTCGGTACCTACTAA
10      70      80      90      100     110     120
      GCCGTTCTCATTGTGTGTCCTGACAGTGGTGGCAGTGACCATAGGTCTCTCTGGTTCAC
      CGGCAAGAGTAACACAACAGGGACTGTCCACCCTCCTGCTATCCAGAGGACCAAGTG
15      130     140     150     160     170     180
      TTCCCTAGTATTTGACCAAAAAGGAGTACTATCATGGCTCCCTTTAAATTTTAGATCCA
      AAGGATCATAAACTGGTTTTTTTCTCATGATAGTACCGAGGAAATTTTAAATCTAGGT
20      190     200     210     220     230     240
      CAAATCAATAACAATTCGGACAAGCAACACATATCACTTAAGGACTTACGAGAGAGCG
      GTTTAGTTATTTGTTAAAGCCTGTTTCGTTGTATAGTTGAATTCCTGAATGCTCTCTGC
25      250     260     270     280     290     300
      ACCGAAATTTGGTGGATGAGATATTTATAGATTCAGCCTGGAGAAAAATTAATCAAG
      TGGCTTTTAAACCACTACTCTATAAATATCTAAGTCGGACCTCTTTTAAATATAGTTC
30      310     320     330     340     350     360
      AACCAAGTAGTCAGACTGACTCCAGAGGAAGATGGTGTGAAGTAGATGTCTATTGGTG
      TTGGTTCATCAGTCTGACTGAGGTCTCTCTTCTACCACACTTCTATCTACAGTAATACCAC
35      370     380     390     400     410     420
      TTCCAGTTCCTCTCTACTGACCAAGGGCAGTAAGAGAGAGAAATCCAAAGCATCTTA
      AAGGTCAAGGGGAGATGACTGTGTTCCCGTCACTCTCTCTTTTAGGTTCGTAGAAAT
40      430     440     450     460     470     480
      AATCAGAGATAAGGAATTTAAGAGCCTTGCCAAATAATGCCTCATCAGTTCAAGTTAAT
      TTAGTCTTCTATTCTCTTAAATTCGGAACGGTTATTACGGAGTAGTCAAGTTCAATTA
45      490     500     510     520     530     540
      GCAATGAGCTCATCAACAGGGGAGTTAACTGTCCAGCAGGTTGTGTAACAGAGTTGTT
      CGTTACTCGAGTAGTGTGCTCCCTCAATTGACAGGTTCGTTCAACCAATTGTCTCAACA
50      550     560     570     580     590     600
      CCATTAAACGTCAACAGAAATAGCATCTGGAGTCATTGCAACCAAGCGCGCTGGCCTTGG
      GGTAATTTGCAGTTGCTCTATCGTAGACCTCAGTAACGTGGGTTCCGCCGACCGGAACC
55      610     620     630     640     650     660
      CAAGCTTCCCTTCAGTATGATAACATCCATCAGTGTGGGGCCACCTTGATTAGTAAACAC
      GTTCGAAGGGAGTCTATCTATTGTAGGTAGTCACACCCCGGTGGAACCTAATCATTTGTG
60      670     680     690     700     710     720
      TGGCTTGTCACTGCAGCACACTGCTTCCAGAAGTATAAAATCCACATCAATGGAGTGT
      ACCGAACAGTGACGTCGTGTGACGAAGTCTTCATATTTTIAAGTGTAGTTACCTGACAA
75      730     740     750     760     770     780
      AGTTTTGGACAAAAATCAACCTCCCTTAAAGAAAGAAATGTCAGAAAGATTTATATATC
      TCAAAACCTTGTTTTAGTTGGGAGGGAATTACTTTTCTTACAGTCTTCTAAATAATAG
80      790     800     810     820     830     840
      CATGAGAAGTACCGCTCTGCAGCAAGAGGTACGACATTGCTGTGTGTGAGGTCCTCTTCC
      GTACTCTTCATGGCGAGAGCTCGTCTCTCATGCTGTAACGACACAACGTCAGAGAGAGG
85      850     860     870     880     890     900
      AGATTCACCTTTTCGGATGACATACGCCGGAATTTGTTGCCAGAGAGCTCTGCATCCTTC
      TCTCAGTGGAAAGCCTACTGTATCGGCCCTAAACAAACGCTCTTCGAGAGCTAGGAG
```

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-150-

910 920 930 940 950 960
CAACCAATTTGACTGTCCACATCAGGATTGGAGCATTACTAAGTGGGGGAATCC
GTTGGTTTAAACTGACAGGTGTAGTGTCTTAAACCTCGTGAAATGATACCCCCCTTAGG

5 970 980 990 1000 1010 1020
CAAAATGATCTCCGAGAGCCAGAGTGAATATCATAGTGACGATGTCTGCAGCAACCA
GTTTACTAGAGGCTCTTCGGTCTCACTTTTAGTATTCACTACAGACGTTTCGTTGGT

10 1030 1040 1050 1060 1070 1080
CAGGTGTATGGCAATGATATAAAACCTGGGAATGTTCTGTGCGGATATATGGAAGGAATT
GTCCACATACCGTTACTATATTTTGGACCTTACAAGACACGGCCTATATACCTTCTTAA

15 1090 1100 1110 1120 1130 1140
TATGATGCCCTGCAGGGGTGATTCTGGGGGACCTTTAGTCACAAGGGATCTGAAGATACG
ATACTACGGACGTCCCACTAAGACCCCTGGAAATCAGTGTTCCTTAGACTTTCTATGC

20 1150 1160 1170 1180 1190 1200
TGGTATCTCATTTGGAATTGTAAAGCTGGGAGATACTGTGGTCAAAAGGACAAGCCTGGA
ACCATAGAGTAACCTTAACATTCGACCCCTCTATTGACACGAGTTTCTGTTTCGGACCT

25 1210 1220 1230 1240 1250
GTCTACACACAGTGACTTATTACGAACTGGATTGCTTCNAAAACAGGCATCTAA
CAGATGTGTGTTCACTGAATAATGGCTTTGACCTAACGAAGTTTTTGTCCTAGATT

MTSP9 full-length protein sequence
Sequence Range: 1 to 419

30 10 20 30 40 50 60
MMYRTVGFGRSRNLKFWIAVLIVLSLTVVAVTIIGLLVHFLVFDQKKEYYHGSFKILDP
1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED) >

35 70 80 90 100 110 120
QINNPFQSNFYQLKDLRETTENLVDRIFIDSANKKNYIKNQVVRLTPREDGVKVDVIMV
1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED) >

40 130 140 150 160 170 180
PQFPSTEQRAVREKKIQSILNQKIRMLRALPINASSVQVMAMSSSTGELTVQASCGKRUV
1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED) >

45 190 200 210 220 230 240
PLNVNRIASGVIAPKAAMPQASLQYDNIHQCGATLISNTWLVTAAHCFQKYKNPHQWIV
1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED) >

50 250 260 270 280 290 300
SFGTKINPFLMKRNVRRFIIHEKYRSAREYDIAVVQVSSRVTFSDDKRIICLPEASASF
1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED) >

55 310 320 330 340 350 360
QPNLTIVHITGFGALYGGESQNDLREARVKIISDDVKQPOVYGNDIKPGMFCAGYMEGI
1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED) >

370 380 390 400 410
YDACRQDSGGPLVTRDLKDTWYLIGTVSWCDMCGKDKPGVVTQVYYRNIASKTGI*
1 TO 1257 OF MTSP9/CODING/CDNA/FINAL (TRANSLATED) >

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-151-

EXAMPLE 2**Expression of the protease MTSP domains**

Nucleic acid encoding each the MTSP9 and protease domain thereof was cloned into a derivative of the *Pichia pastoris* vector pPIC9K (available from
 5 Invitrogen; see SEQ ID NO. 11). Plasmid pPIC9K features include the 5' AOX1 promoter fragment at 1-948; 5' AOX1 primer site at 855-875; alpha-factor secretion signal(s) at 949-1218; alpha-factor primer site at 1152-1172; multiple cloning site at 1192-1241; 3' AOX1 primer site at 1327-1347; 3' AOX1 transcription termination region at 1253-1586; HIS4 ORF at 4514-1980;
 10 kanamycin resistance gene at 5743-4928; 3' AOX1 fragment at 6122-6879; ColE1 origin at 7961-7288; and the ampicillin resistance gene at 8966-8106. The plasmid is derived from pPIC9K by eliminating the XhoI site in the kanamycin resistance gene and the resulting vector is herein designated pPIC9Kx.

15 C122S mutagenesis of the Protease domain of MTSP9

The gene encoding the protease domain of MTSP9 was mutagenized by PCR SOE (PCR-based splicing by overlap extension) to replace the unpaired cysteine at position 122 (chymotrypsin numbering system; Cys₂₀₂ in MTSP9) with a serine. Two overlapping gene fragments, each containing the AGT codon
 20 for serine at position 122 were PCR amplified using the following primers: for the 5' gene fragment, TCTCTCGAGAAAAGAATAGCATCTGGAGTCATTGCACCC (SEQ ID NO. 13) and AGAGGCTTCTGGCAAATAATCGGCGTATGTC (SEQ ID NO. 14); for the 3' gene fragment, ATTCGCGGCCGCTTAGATGCCTGTTTTGAAGCAAT (SEQ ID NO. 21) and
 25 GACATACGCCGATTAGTTTGCCAGAAGCCTCT (SEQ ID NO. 22). The amplified gene fragments were purified on a 1% agarose gel, mixed and reamplified by PCR to produce the full length coding sequence for the protease domain of MTSP9 C122S. This sequence was then cut with restriction enzymes NotI and XhoI, and ligated into vector pPic9KX.

30 MTSP9 fermentation and initial product recovery**Fermentation**

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-152-

P. pastoris clone GS115/pPIC9K:MTSP9 C122S Sac MC2 expressing the C122S mutant form of MTSP9 was fermented at the 5 liter scale. An overnight culture of 200 ml (OD600 of approximately 25) was used to inoculate 3.2 liters of fermentation medium in each of four Bioflo vessels (New Brunswick Scientific, Edison, NJ). The batch phase complex medium contained 10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 40 g/l glycerol, 5 g/l ammonium sulfate, 0.2 g/l calcium sulfate(dihydrate), 2 g/l magnesium sulfate(heptahydrate), 2 g/l potassium sulfate, 25 g/l sodium hexametaphosphate, and 4.35 ml/l PTM1 (6.0 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/l NaI , 3.0 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/l H_3BO_3 , 0.5 g/l CoCl_2 , 20.0 g/l ZnCl_2 , 65.0 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l biotin, 5.0 ml/l H_2SO_4). The culture was grown at a pH of 5.0 and a temperature of 28 °C in the batch phase. Concentrated ammonium hydroxide was used to maintain the pH of the culture. KFO 880 (KABO Chemicals, Cheyenne, WY) was used as needed to control foaming (see, *e.g.*, Zhang *et al.* (2000) Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimizing the Production of a Recombinant Protein, the Heavy-Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin, Serotype A. Biotechnology and Bioengineering Vol. 70, No 1).

The batch phase of the fermentation lasted about 22 hours at which time the culture had consumed all of the initial glycerol in the medium. A substrate limited fed-batch of 50% (w/v) glycerol was initiated at 18 ml/lxhr at this point. Two hours into the glycerol fed-batch the pH of the culture was linearly increased from 5.0 to 7.0 over a two hour period by concentrated ammonium hydroxide addition. The glycerol fed-batch was about 4.5 hours in duration. The cultures reached densities of 220-250 g/l wet cell weight by this point.

Methanol induction was initiated following the end of the glycerol fed-batch phase. The culture was transitioned to methanol utilization by the method of Zhang *et al.* by adding 1.5 ml of methanol per liter of culture and linearly decreasing the glycerol feed rate from 18 ml/l*hr to 0 ml/l*hr over a 3 hour period. The methanol addition served as an on-line calibration of the MeOH Sensor (Raven Biotech, Vancouver, BC, Canada) used to control the fermenter throughout induction. After the initial amount methanol was utilized, as indicated by the MeOH Sensor, another 1.5 ml/l was added to the culture and the MeOH

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-153-

sensor was used to control the methanol concentration in the fermenter at that level throughout the induction phase. The methanol fed to the fermenter was supplemented with 2 ml/l PTM4 solution (2.0 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/l NaI, 3.0 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/l H_3BO_3 , 0.5 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7.0 g/l ZnCl_2 , 22.0 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l biotin, 1.0 ml/l H_2SO_4). The induction phase lasted about 42.5 hours.

Initial Product Recovery

The supernatant from each of the fermentations was harvested by centrifugation, pooled, and then was concentrated to about 0.5 liter using a 10 kDa ultrafiltration cartridge (A/G Technologies Corp., Needham, MA) on a SRT5 ultrafiltration system (North Carolina SRT, Cary, NC). The concentrate was drained from the system, then the system was rinsed with a volume of 50 mM Hepes, pH 7.0 equal to the concentrated material. The concentrate and the rinse material were combined to yield the final ultrafiltration product of about 1 liter. A final clarification of the supernatant was done with a SartoBran 300 0.45 μm capsule filter (Sartorius Separations Div., Edgewood, NJ).

Protein Purification ~ MTSP9

Concentrated fermentation supernatant of glycosylated MTSP9 was dialyzed against 50mM HEPES, pH 7.0, filtered and loaded directly onto 147mL SP Sepharose cation exchange column (Amersham-Pharmacia Biotech) which was pre-equilibrated with 50mM HEPES, pH 7.0. Protein was eluted using a linear gradient of 0-500mM NaCl over 7 column volumes at a flow rate of 5mL/min.

Active fractions were pooled then dialyzed against 50mM Na_2HPO_4 , pH 5.5 overnight. Purified, glycosylated MTSP9 was then deglycosylated by the addition 0.1 ml of Endoglycosidase H (ProZyme, 5 U/ml) per mg of protein and incubating overnight at 4°C with gentle swirling. The dialyzed protein solution was then adjusted to pH 7, filtered and and loaded directly onto 147mL SP Sepharose cation exchange column and eluted as described above. Active fractions were pooled and benzamidine was added to a final concentration of 10 mM. Protein purity was examined by SDS-PAGE and protein concentration

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-154-

determined by measurement of OD₂₈₀ and use of a theoretical extinction coefficient of 2.017 ml/(mg x OD₂₈₀).

EXAMPLE 3**Assays for identification of candidate compounds that modulate that activity of an MTSP****Assay for identifying inhibitors**

The ability of test compounds to act as inhibitors of catalytic activity of an MTSP9 can be assessed in an amidolytic assay. The inhibitor-induced inhibition of amidolytic activity by a recombinant MTSP or the protease domain portions thereof, can be measured by IC50 values in such an assay.

The protease domain of MTSP9 expressed as described above is assayed in Costar 96 well tissue culture plates (Corning NY) for inhibition by various test compounds as follows. Approximately 1-10 nM protease is added without inhibitor, or with 100000 nM inhibitor and seven 1:6 dilutions into 1X direct buffer (29.2 mM Tris, pH 8.4, 29.2 mM Imidazole, 217 mM NaCl (100 μ L final volume)), and allowed to incubate at room temperature for 30 minutes. 400 μ M substrate S 2366 (L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride; DiaPharma, Westchester, OH) is added and the reaction is monitored in a SpectraMAX Plus microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA) by following change in absorbance at 405 nm for 20 minutes at 37°C.

Identification of substrates

Particular substrates for use in the assays can be identified empirically by testing substrates. The following list of substrates are exemplary of those that can be tested.

Substrate name	Structure
S 2366	pyroGlu-Pro-Arg-pNA.HCl
spectrozyme t-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA.AcOH
N-p-tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA	N-p-tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA
Benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA	Benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA
Pefachrome t-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA
S 2765	N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl
S 2444	pyroGlu-Gly-Arg-pNA.HCl
S 2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl
spectrozyme UK	Cbo-L-(γ)Glu(α -t-BuO)-Gly-Arg-pNA.2AcOH
S 2302	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-155-

5	S 2266	H-D-Val-Leu-Arg-pNA.2HCl
	S 2222	Bz-Ile-Glu(g-OR)-Gly-Arg-pNA.HCl R = H(50%) and R = CH ₃ (50%)
	Chromozyme PK	Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA
	S 2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl
	S 2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA.2HCl
	Spectrozyme PI	H-D-Nle-HHT-Lys-pNA.2AcOH
		Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC
		H-Arg-Gln-Arg-Arg-AMC
		Boc-Gln-Gly-Arg-AMC
	10	Z-Arg-Arg-AMC
	Spectrozyme THE	H-D-HHT-Ala-Arg-pNA.2AcOH
	Spectrozyme fXIIa	H-D-CHT-Gly-Arg-pNA.2AcOH
		CVS 2081-6 (MeSO ₂ -dPhe-Pro-Arg-pNA)
		Pefachrome fVIIa (CH ₃ SO ₂ -D-CHA-But-Arg-pNA)

15 pNA = para-nitranilide (chromogenic)

AMC = amino methyl coumarin (fluorescent)

If none of the above substrates are cleaved, a coupled assay, described above, can be used. Briefly, test the ability of the protease to activate and enzyme, such as plasminogen and trypsinogen. To perform these assays, the single chain protease is incubated with a zymogen, such as plasminogen or trypsinogen, in the presence of the a known substrate, such, lys-plasminogen, for the zymogen. If the single chain activates the zymogen, the activated enzyme, such as plasmin and trypsin, will degrade the substrate therefor.

MTSP-9 Assay for screening modulators

25 The protease domain of MTSP9 expressed in *Pichia pastoris* was assayed for inhibition by various test compounds in Costar 96 well tissue culture plates (Corning NY). Approximately 1-20 nM MTSP9 was added without inhibitor, or with 100000 nM inhibitor and 7 1:6 dilutions to 1X direct buffer (29.2 mM Tris, pH 8.4, 29.2 mM Imidazole, 217 mM NaCl (100 μ L final volume)), and allowed to incubate at room temperature for 30 minutes. 400 μ M substrate pefachrome FVIIa (Pentapharm,, Norwalk, CT) was added and the reaction was monitored in a SpectraMAX Plus microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA) by following change in absorbance at 405 nm for 20 minutes at 37°C.

EXAMPLE 4

Other Assays

These assays are described with reference to MTSP1, but such assays can be readily adapted for use with MTSP9.

5 **Amidolytic Assay for Determining Inhibition of Serine Protease Activity of Matriptase or MTSP1**

The ability of test compounds to act as inhibitors of rMAP catalytic activity was assessed by determining the inhibitor-induced inhibition of amidolytic activity by the MAP, as measured by IC_{50} values. The assay buffer
10 was HBSA (10 mM Hepes, 150mM sodium chloride, pH 7.4, 0.1% bovine serum albumin). All reagents were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

Two IC_{50} assays (a) one at either 30-minutes or 60-minutes (a 30-minute or a 60-minute preincubation of test compound and enzyme) and (b) one at
15 0-minutes (no preincubation of test compound and enzyme) were conducted. For the IC_{50} assay at either 30-minutes or 60-minutes, the following reagents were combined in appropriate wells of a Corning microtiter plate: 50 microliters of HBSA, 50 microliters of the test compound, diluted (covering a broad concentration range) in HBSA (or HBSA alone for uninhibited velocity
20 measurement), and 50 microliters of the rMAP (Corvas International) diluted in buffer, yielding a final enzyme concentration of 250 pM as determined by active site filtration. Following either a 30-minute or a 60-minute incubation at ambient temperature, the assay was initiated by the addition of 50 microliters of the substrate S-2765 (N- α -Benzyloxycarbonyl-D-arginyl-L-glycyl-L-arginine-p-
25 nitroaniline dihydrochloride; DiaPharma Group, Inc.; Franklin, OH) to each well, yielding a final assay volume of 200 microliters and a final substrate concentration of 100 μ M (about 4-times K_m). Before addition to the assay mixture, S-2765 was reconstituted in deionized water and diluted in HBSA. For the IC_{50} assay at 0 minutes; the same reagents were combined: 50 microliters of
30 HBSA, 50 microliters of the test compound, diluted (covering the identical concentration range) in HBSA (or HBSA alone for uninhibited velocity measurement), and 50 microliters of the substrate S-2765. The assay was

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-157-

initiated by the addition of 50 microliters of rMAP. The final concentrations of all components were identical in both IC_{50} assays (at 30- or 60- and 0-minute).

The initial velocity of chromogenic substrate hydrolysis was measured in both assays by the change of absorbance at 405 nm using a Thermo Max®

- 5 Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices) over a 5 minute period, in which less than 5% of the added substrate was used. The concentration of added inhibitor, which caused a 50% decrease in the initial rate of hydrolysis was defined as the respective IC_{50} value in each of the two assays (30- or 60-minutes and 0-minute).

10 ***In vitro* enzyme assays for specificity determination**

The ability of compounds to act as a selective inhibitor of matriptase activity was assessed by determining the concentration of test compound that inhibits the activity of matriptase by 50%, (IC_{50}) as described in the above Example, and comparing IC_{50} value for matriptase to that determined for all or

- 15 some of the following serine proteases: thrombin, recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), plasmin, activated protein C, chymotrypsin, factor Xa and trypsin.

The buffer used for all assays was HBSA (10 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 0.1 % bovine serum albumin).

- 20 The assay for IC_{50} determinations was conducted by combining in appropriate wells of a Corning microtiter plate, 50 microliters of HBSA, 50 microliters of the test compound at a specified concentration (covering a broad concentration range) diluted in HBSA (or HBSA alone for V_0 (uninhibited velocity) measurement), and 50 microliters of the enzyme diluted in HBSA. Following a
- 25 30 minute incubation at ambient temperature, 50 microliters of the substrate at the concentrations specified below were added to the wells, yielding a final total volume of 200 microliters. The initial velocity of chromogenic substrate hydrolysis was measured by the change in absorbance at 405 nm using a Thermo Max® Kinetic Microplate Reader over a 5 minute period in which less
- 30 than 5% of the added substrate was used. The concentration of added inhibitor which caused a 50% decrease in the initial rate of hydrolysis was defined as the IC_{50} value.

-158-

Thrombin (fIIa) Assay

Enzyme activity was determined using the chromogenic substrate, Pefachrome t-PA (CH_3SO_2 -D-hexahydrotyrosine-glycyl-L-Arginine-p-nitroaniline, obtained from Pentapharm Ltd.). The substrate was reconstituted in deionized water prior to use. Purified human α -thrombin was obtained from Enzyme Research Laboratories, Inc. The buffer used for all assays was HBSA (10 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 0.1% bovine serum albumin).

IC_{50} determinations were conducted where HBSA (50 μL), α -thrombin (50 μL) (the final enzyme concentration is 0.5 nM) and inhibitor (50 μL) (covering a broad concentration range), were combined in appropriate wells and incubated for 30 minutes at room temperature prior to the addition of substrate Pefachrome-t-PA (50 μL) (the final substrate concentration is 250 μM , about 5 times K_m). The initial velocity of Pefachrome t-PA hydrolysis was measured by the change in absorbance at 405 nm using a Thermo Max[®] Kinetic Microplate Reader over a 5 minute period in which less than 5% of the added substrate was used. The concentration of added inhibitor which caused a 50% decrease in the initial rate of hydrolysis was defined as the IC_{50} value.

Factor Xa

Factor Xa catalytic activity was determined using the chromogenic substrate S-2765 (N-benzoyloxycarbonyl-D-arginine-L-glycine-L-arginine-p-nitroaniline), obtained from DiaPharma Group (Franklin, OH). All substrates were reconstituted in deionized water prior to use. The final concentration of S-2765 was 250 μM (about 5-times K_m). Purified human Factor X was obtained from Enzyme Research Laboratories, Inc. (South Bend, IN) and Factor Xa (FXa) was activated and prepared from it as described [Bock, P.E., Craig, P.A., Olson, S.T., and Singh, P. *Arch. Biochem. Biophys.* 273:375-388 (1989)]. The enzyme was diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 0.25 nM.

Recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) Assay

rt-PA catalytic activity was determined using the substrate, Pefachrome t-PA (CH_3SO_2 -D-hexahydrotyrosine-glycyl-L-arginine-p-nitroaniline, obtained from Pentapharm Ltd.). The substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 500

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-159-

micromolar (about 3-times Km). Human rt-PA (Activase®) was obtained from Genentech Inc. The enzyme was reconstituted in deionized water and diluted into HBSA prior to the assay in which the final concentration was 1.0 nM.

Plasmin Assay

- 5 Plasmin catalytic activity was determined using the chromogenic substrate, S-2366 (L-pyrroglutamyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride), which was obtained from DiaPharma group. The substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 300 micromolar (about 2.5-times Km).
- 10 Purified human plasmin was obtained from Enzyme Research Laboratories, Inc. The enzyme was diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 1.0 nM.

Activated Protein C (aPC) Assay

- aPC catalytic activity was determined using the chromogenic substrate,
- 15 Pefachrome PC (delta-carbobenzoxym-L-lysine-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride), obtained from Pentapharm Ltd.). The substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 400 micromolar (about 3-times Km). Purified human aPC was obtained from Hematologic Technologies, Inc. The enzyme was diluted
- 20 into HBSA prior to assay in which the final concentration was 1.0 nM.

Chymotrypsin Assay

- Chymotrypsin catalytic activity was determined using the chromogenic substrate, S-2586 (methoxy-succinyl-L-arginine-L-prolyl-L-tyrosyl-p-nitroanilide), which was obtained from DiaPharma Group. The substrate was made up in
- 25 deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 100 micromolar (about 9-times Km). Purified (3X-crystallized; CDI) bovine pancreatic alpha-chymotrypsin was obtained from Worthington Biochemical Corp. The enzyme was reconstituted in deionized water and diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 0.5 nM.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-160-

Trypsin Assay

Trypsin catalytic activity was determined using the chromogenic substrate, S-2222 (benzoyl-L-isoleucine-L-glutamic acid-[gamma-methyl ester]-L-arginine-p-nitroanilide), which was obtained from DiaPharma Group. The
5 substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 250 micromolar (about 4-times Km). Purified (3X-crystallized; TRL3) bovine pancreatic trypsin was obtained from Worthington Biochemical Corp. The enzyme was reconstituted in deionized water and diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was
10 0.5 nM.

Since modifications will be apparent to those of skill in this art, it is intended that this invention be limited only by the scope of the appended claims.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-161-

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A substantially purified single or two chain polypeptide, comprising the protease domain of a type-II membrane-type serine protease 9 (MTSP9) or a catalytically active portion thereof.
- 5 2. The polypeptide of claim 1 that is an activated two chain protein.
3. A polypeptide of claim 1 selected from the group consisting of a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 and includes at least about 85% amino acid sequence identity with the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 18;
- 10 a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 17;
- a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by a sequence of nucleotides that hybridizes along at least 70% of its full-length under conditions of high stringency to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- 15 a polypeptide that comprises the sequence of amino acids set forth as amino acids 11-242 or SEQ ID No. 18;
- 20 a polypeptide that comprises a sequence of amino acids having at least about 90% sequence identity with the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 or 18; and
- a polypeptide that is encoded by a sequence of nucleotides that is a splice variant of the sequence set forth in SEQ ID No. 17.
- 25 4. The polypeptide of claim 1, wherein: the MTSP9 portion of the polypeptide consists essentially of the protease domain of the MTSP9 or a catalytically active portion thereof.
5. The substantially purified polypeptide of claim 1, wherein the MTSP9 is a human polypeptide.
- 30 6. The substantially purified polypeptide of claim 1 that consists essentially of the protease domain of MTSP9 or a catalytically active portion of the protease domain of MTSP9.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-162-

7. The substantially purified polypeptide of claim 3 that consists essentially of the protease domain of MTSP9 or a catalytically active portion of the protease domain of MTSP9.

8. The substantially purified polypeptide of claim 1 that comprises the
5 sequence of amino acids set forth as amino acids 11-242 in SEQ ID No. 6.

9. The substantially purified polypeptide of claim 1 that comprises the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 18.

10. The substantially purified polypeptide of claim 1, wherein the
10 protease domain comprises the sequence of amino acids set forth as amino acids 11-242 of SEQ ID No. 6.

11. The substantially purified polypeptide of claim 1 that has more than about 80% sequence identity with a polypeptide that comprises the sequence of amino acids set forth as SEQ ID No. 6 or as the sequence of amino acids set forth as SEQ ID No. 18, wherein the polypeptide is a protease.

15 12. A polypeptide of claim 1, wherein the protease domain portion is encoded by a nucleic acid molecule that hybridizes under conditions of high stringency along at least 70% of its full-length to a nucleic acid molecule comprising a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17, or at least one domain thereof or a catalytically
20 active portion of the domain.

13. The polypeptide of claim 12, wherein the domain is the protease domain.

14. The polypeptide of claim 1, wherein:
the polypeptide does not comprise the complete sequence set forth in
25 SEQ ID No. 18 and includes at least amino acids 85-87 and/or 160-165 of SEQ ID No. 18.

15. A polypeptide of claim 3 that is a mutein, wherein:
up to about 50% of the amino acids are replaced with another amino
acid;

30 and the resulting polypeptide is a single chain or two chain polypeptide that has catalytic activity of at least 10% of the unmutated polypeptide.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-163-

16. The polypeptide of claim 15, wherein up to about 10% of the amino acids are replaced with another amino acid.
17. The polypeptide of claim 15, wherein the resulting polypeptide is a single chain or two chain polypeptide and has catalytic activity of at least 50% of the unmutated polypeptide.
18. The polypeptide of claim 15, wherein a free Cysteine in the protease domain is replaced with another amino acid.
19. The polypeptide of claim 18, wherein the replacing amino acid is a serine.
20. An isolated substantially pure polypeptide that consists essentially of the protease domain of MTSP9.
21. A nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of any of claims 1-20.
22. The nucleic acid molecule of claim 21 that comprises a sequence of nucleotides selected from the group consisting of:
- (a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
 - (b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length or along at least about 70% of the full-length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
 - (c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No. 16;
 - (d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);
 - (e) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain or a catalytically active portion thereof that includes a sequence of nucleotides having at least about 60%, 70%, 80%, 90% or 95% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17; and
 - (f) a sequence of nucleotides comprising degenerate codons of (a), (b), (c), (d) or (e).
23. An isolated nucleic molecule that encodes a mutein of claim 15.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-164-

- 24. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 21.
- 25. The vector of claim 24 that is an expression vector.
- 26. The vector of claim 24 that is a eukaryotic vector.
- 27. The vector of claim 25 that includes a sequence of nucleotides
- 5 that directs secretion of any polypeptide encoded by a sequence of nucleotides operatively linked thereto.
- 28. The vector of claim 24 that is a *Pichia* vector or an *E. coli* vector.
- 29. A cell, comprising the vector of claim 24.
- 30. The cell of claim 29 that is a prokaryotic cell.
- 10 31. The cell of claim 29 that is a eukaryotic cell.
- 32. The cell of claim 29 that is selected from among a bacterial cell, a yeast cell, a plant cell, an insect cell and an animal cell.
- 33. The cell of claim 29 that is a mammalian cell.
- 34. A nucleic acid molecule encoding a polypeptide of claim 6.
- 15 35. A vector, comprising nucleic acid molecule of claim 34.
- 36. A cell, comprising the vector of claim 35.
- 37. A recombinant non-human animal, wherein an endogenous gene that encodes a polypeptide of claim 1 has been deleted or inactivated by homologous recombination or insertional mutagenesis of the animal or an
- 20 ancestor thereof.
- 38. A method for producing a polypeptide that contains a protease domain of an MTSP9 polypeptide, comprising:
 - culturing the cell of claim 29 under conditions whereby the encoded polypeptide is expressed by the cell; and
 - 25 recovering the expressed polypeptide.
- 39. The method of claim 38, wherein the polypeptide is secreted into the culture medium.
- 40. The method of claim 38, wherein the cell is a *Pichia* cell.
- 41. The method of claim 38, wherein the polypeptide is expressed in
- 30 the cytoplasm of the host cell.
- 42. A method for producing a polypeptide that contains a protease domain of a polypeptide, comprising:

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-165-

culturing the cell of claim 36 under conditions whereby the encoded polypeptide is expressed by the cell; and
recovering the expressed polypeptide.

43. An antisense nucleic acid molecule that comprises at least 14
5 contiguous nucleotides or modified nucleotides that are complementary to a
contiguous sequence of nucleotides encoding the protease domain of an MTSP9
of claim 1; or

comprises at least 16 contiguous nucleotides or modified nucleotides that
are complementary to a contiguous sequence of nucleotides encoding the
10 protease domain of an MTSP9 of any of claims 1-20; or

comprises at least 30 contiguous nucleotides or modified nucleotides that
are complementary to a contiguous sequence of nucleotides encoding the
protease domain of an MTSP9 of any of claims 1-20, wherein the antisense
molecule does include nucleotides 1162-1262 of SEQ ID No. 18.

15 44. The antisense molecule of claim 43 that includes a contiguous
sequence of nucleotides that is the complement of the sequence of nucleotides
set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17.

45. A double-stranded RNA (dsRNA) molecule that comprises at least
about 21 contiguous nucleotides or modified nucleotides from the sequence of
20 nucleotides encoding an MTSP9 of any of claims 1-20.

46. An antibody that specifically binds to the single chain form and/or
two-chain form of a protease domain of the polypeptide of any of claims 1-20,
or a fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof,
wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody.

25 47. The antibody of claim 46 that inhibits the enzymatic activity of the
polypeptide.

48. An antibody that specifically binds to the single chain form and/or
two-chain form of a protease domain of the polypeptide of claim 3, or a
fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof,
30 wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody and it
inhibits the enzymatic activity of the polypeptide.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-166-

49. An antibody that specifically binds to the single chain form and/or two-chain form of a protease domain of the polypeptide of claim 6, or a fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof, wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody and it
5 inhibits the enzymatic activity of the polypeptide.
50. A conjugate, comprising:
a polypeptide of any of claims 1-20, and
a targeting agent linked to the polypeptide directly or via a linker.
- 10 51. The conjugate of claim 50, wherein the targeting agent permits
affinity isolation or purification of the conjugate;
attachment of the conjugate to a surface;
detection of the conjugate; or
targeted delivery to a selected tissue or cell.
- 15 52. A conjugate, comprising:
a polypeptide of claim 3; and
a targeting agent linked to the polypeptide directly or via a linker.
- 20 53. The conjugate of claim 52, wherein the targeting agent permits
affinity isolation or purification of the conjugate;
attachment of the conjugate to a surface;
detection of the conjugate; or
targeted delivery to a selected tissue or cell.
54. A conjugate, comprising:
a polypeptide of claim 6; and
a targeting agent linked to the polypeptide directly or via a linker.
- 25 55. The conjugate of claim 54, wherein the targeting agent permits
affinity isolation or purification of the conjugate;
attachment of the conjugate to a surface;
detection of the conjugate; or
targeted delivery to a selected tissue or cell.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-167-

56. A combination, comprising:
 an agent or treatment that inhibits the catalytic activity of the
 polypeptide of any of claims 1-20; and
 another treatment or agent selected from anti-tumor and anti-
 5 angiogenic treatments and agents.
57. The combination of claim 56, wherein the inhibitor and the anti-
 tumor and/or anti-angiogenic agent are formulated in a single pharmaceutical
 composition or each is formulated in separate pharmaceutical compositions.
58. The combination of claim 56, wherein the inhibitor is selected from
 10 antibodies and antisense oligonucleotides and double-stranded RNA (dsRNA).
59. A solid support comprising two or more polypeptides of any of
 claims 1-20 linked thereto either directly or via a linker.
60. The support of claim 59, wherein the polypeptides comprise an
 array.
- 15 61. The support of claim 59, wherein the polypeptides comprise a
 plurality of different protease domains.
62. A solid support comprising two or more nucleic acid molecules of
 claim 21 or oligonucleotides portions thereof linked thereto either directly or via
 a linker, wherein the oligonucleotides contain at least 16 nucleotides.
- 20 63. The support of claim 62, wherein the nucleic acid molecules
 comprise an array.
64. The support of claim 62, wherein the nucleic acid molecules
 comprise a plurality of molecules that encode different protease domains.
65. A method for identifying compounds that modulate the protease
 25 activity of a polypeptide, comprising:
 contacting a polypeptide of any of claims 1-20 with a substrate that is
 proteolytically cleaved by the polypeptide, and, either simultaneously, before or
 after, adding a test compound or plurality thereof;
 measuring the amount of substrate cleaved in the presence of the test
 30 compound; and

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-168-

selecting compounds that change the amount of substrate cleaved compared to a control, whereby compounds that modulate the activity of the polypeptide are identified.

66. The method of claim 65, wherein the test compounds are small
5 molecules, peptides, peptidomimetics, natural products, antibodies or fragments thereof that modulate the activity of the polypeptide.

67. The method of claim 65, wherein a plurality of the test substances are screened simultaneously.

68. The method of claim 65, wherein the polypeptide consists
10 essentially of a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides selected from the group consisting of a sequence of nucleotides that:

(a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along
15 its length or along at least about 70% of the full-length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No.
16;

20 (d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);

(e) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain or a catalytically active portion thereof thereof that includes a sequence of nucleotides having at least about 80% or 85% sequence identity the the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17;

25 and and

(f) a sequence of nucleotides comprising degenerate codons of (a), (b), (c), (d) or (e).

69. The method of claim 65, wherein the polypeptide consists essentially of a polypeptide selected from the group consisting of:

30 a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5;

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-169-

a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 17;

a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of high stringency to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

a polypeptide that comprises the sequence of amino acids set forth as amino acids 11-242 in SEQ ID No. 16;

a polypeptide that comprises a sequence of amino acids having at least about 60% sequence identity with the sequence of amino acids set forth as amino acids 11-242 in SEQ ID No. 6 or the sequence of amino acids in SEQ ID No. 18; and

a polypeptide that is encoded by a sequence of nucleotides that is a splice variant of the sequence set forth in SEQ ID No. 18.

70. The method of claim 65, wherein the change in the amount of substrate cleaved is assessed by comparing the amount of substrate cleaved in the presence of the test compound with the amount of substrate cleaved in the absence of the test compound.

71. The method of claim 67, wherein a plurality of the polypeptides are linked to a solid support, either directly or via a linker.

72. The method of claim 71, wherein the polypeptides comprise an array.

73. A method of identifying a compound that specifically binds to a single-chain and/or two-chain protease domain and/or to single or two-chain polypeptide and/or to a proteolytically active portion of the single or two chain form thereof of an MTSP9 polypeptide, comprising:

contacting an MTSP9 polypeptide of any of claims 1-20 or a proteolytically active portion thereof with a test compound or plurality thereof under conditions conducive to binding thereof; and either:

a) identifying test compounds that specifically bind to the single chain and/or two chain form of the polypeptide or to a proteolytically active portion of the single and/or two chain form thereof, or

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-170-

b) identifying test compounds that inhibit binding of a compound known to bind a single chain and/or two chain form of the polypeptide or to a proteolytically active portion of the single and/or two chain form thereof, wherein the known compound is contacted with the polypeptide before, simultaneously with or after the test compound.

74. The method of claim 73, wherein the polypeptide is linked either directly or indirectly via a linker to a solid support.

75. The method of claim 73, wherein the test compounds are small molecules, peptides, peptidomimetics, natural products, antibodies or fragments thereof.

76. The method of claim 73, wherein a plurality of the test substances are screened simultaneously.

77. The method of claim 73, wherein a plurality of the polypeptides are linked to a solid support.

78. The method of claim 73, wherein the polypeptide consists essentially of a polypeptide encoded by:

(a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length or along at least about 70% of the full-length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No. 16;

(d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);

(e) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain or a catalytically active portion thereof that includes a sequence of nucleotides having at least about 80% or 85% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17;

and and

(f) a sequence of nucleotides comprising degenerate codons of (a), (b), (c), (d) or (e).

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-171-

79. A method for identifying activators of the zymogen form of an MTSP9, comprising:

- contacting a zymogen form of an MTSP9 polypeptide of any of claims 1-20 or a potentially proteolytically active portion thereof with a substrate
- 5 of the activated form of the polypeptide;
- adding a test compound, wherein the test compound is added before, after or simultaneously with the addition of the substrate; and
- detecting cleavage of the substrate, thereby identifying compounds that activate the zymogen.

10 80. The method of claim 79, wherein the substrate is a chromogenic substrate.

81. The method of claim 79, wherein the substrate is a L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride.

15 82. The method of claim 79, wherein the test compound is a small molecule, a nucleic acid or a polypeptide.

83. A method for treating or preventing a neoplastic disease, in a mammal, comprising administering to a mammal an effective amount of an inhibitor of a polypeptide of any of claims 1-20.

20 84. The method of claim 83, wherein the inhibitor is an antibody that specifically binds to the polypeptide, or a fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof, wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody.

85. The method of claim 83, wherein the polypeptide consists essentially of a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that:

- 25 (a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- (b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length or along at least about 70% of the full-length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No.
- 30 17;
- (c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No.
- 16;

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-172-

- (d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);
- (e) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain or a catalytically active portion thereof thereof that includes a sequence of nucleotides having at least about 80% or 85% sequence identity the the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17; and and
- (f) a sequence of nucleotides comprising degenerate codons of (a), (b), (c), (d) or (e).
86. The method of claim 83, wherein the polypeptide comprises a polypeptide encoded by:
- (a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- (b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- (c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No. 16;
- (d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c); and
- (e) degenerate codons of (a), (b), (c) or (d).
87. A method of inhibiting tumor initiation, growth or progression or treating a malignant or pre-malignant condition, comprising administering an agent that inhibits activation cleavage of the zymogen form of an MTSP9 polypeptide of any of claims 1-20 or a potentially proteolytically active portion thereof or inhibits an activity of the activated form of MTSP9 or a proteolytically active portion thereof.
88. The method of claim 87, wherein the condition is a condition of the breast, cervix, prostate, lung, ovary or colon.
89. The method of claim 87, wherein the agent is an antisense oligonucleotide, double-stranded RNA (dsRNA) or an antibody.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-173-

90. The method of claim 87, further comprising administering another treatment or agent selected from anti-tumor and anti-angiogenic treatments or agents.

91. The method of claim 87, wherein the polypeptide consists
5 essentially of a polypeptide encoded by:

(a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length or along at least about 70% of the full-length to the sequence of
10 nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No.
16;

(d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);
15

(e) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain or a catalytically active portion thereof thereof that includes a sequence of nucleotides having at least about 80% or 85% sequence identity the the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17;
and and

20 (f) a sequence of nucleotides comprising degenerate codons of (a), (b), (c), (d) or (e).

92. The method of claim 87, wherein the polypeptide comprises a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that:

(a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID
25 No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;

(c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No.
30 16;

(d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);
and

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-174-

(e) degenerate codons of (a), (b), (c) or (d).

93. A method of identifying a compound that binds to the single-chain and/or two-chain form of an MTSP9 polypeptide of claim and/or to a proteolytically active portion of a single-chain and/or two-chain form of an

5 MTSP9 polypeptide of any of claims 1-20, comprising:

contacting a test compound with both forms;

determining to which form the compound binds; and

if it binds to a form of polypeptide, further determining whether the compound has at least one of the following properties:

10 (i) inhibits activation cleavage of the single-chain zymogen form of polypeptide;

(ii) inhibits activity of the two-chain or single-chain form; and

(iii) inhibits dimerization of the polypeptide.

94. A method of detecting neoplastic disease, comprising: detecting a
15 polypeptide that comprises a polypeptide of any of claims 1-20 in a biological sample, wherein the amount, the form and/or activity detected differs from the amount the form and/or activity of polypeptide detected from a subject who does not have neoplastic disease.

95. The method of claim 94, wherein the biological sample is selected
20 from the group consisting of blood, urine, saliva, tears, synovial fluid, sweat, interstitial fluid, sperm, cerebrospinal fluid, ascites fluid, tumor tissue biopsy and circulating tumor cells.

96. A method of identifying a compound that binds to the single-chain and/or two-chain form of a polypeptide of any of claims 1-20, comprising:

25 contacting a test compound with both forms;

determining to which form or forms the compound binds; and

if it binds to a form of polypeptide, further determining whether the compound has at least one of the following properties:

(i) inhibits activation cleavage of the single-chain zymogen form of
30 polypeptide;

(ii) inhibits activity of the two-chain or single-chain form; and

(iii) inhibits dimerization of the polypeptide.

WO 02/07267

PCT/US02/09611

-175-

97. The method of claim 96, wherein the biological sample is selected from the group consisting of blood, urine, saliva, tears, synovial fluid, sweat, interstitial fluid, cerebrospinal fluid, a sperm sample, ascites fluid, tumor tissue biopsy and circulating tumor cells.

5 98. The method of claim 96, wherein both forms consist essentially of the protease domain.

99. A method of diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, a malignancy, or other pathologic condition in a subject, comprising:

10 obtaining a biological sample from the subject; and
exposing it to a detectable agent that binds to a two-chain and/or single-chain form of an MTSP9 polypeptide, wherein the pathological condition is characterized by the presence or absence of the two-chain or single-chain form.

100. A method of monitoring tumor progression and/or therapeutic effectiveness, comprising detecting and/or quantifying the level, the form and/or
15 activity of an MTSP9 polypeptide in a body tissue or fluid sample.

101. The method of claim 100, wherein the tumor is a tumor of the breast, cervix, prostate, lung, ovary or colon.

102. The method of claim 100, wherein the body fluid is blood, urine, sweat, saliva, cerebrospinal fluid and synovial fluid.

20 103. The polypeptide of any of claims 1-20, wherein:
the polypeptide includes at least amino acids 85-87 and/or 160-165 of SEQ ID No. 18.

104. A method for identifying compounds that modulate the protease activity of an MTSP9 polypeptide, comprising:

25 contacting a polypeptide of any of claims 1-20 or a proteolytically active portion thereof with a substrate that is proteolytically cleaved by the polypeptide, and, either simultaneously, before or after, adding a test compound or plurality thereof;

30 measuring the amount of substrate cleaved in the presence of the test compound; and

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-176-

selecting compounds that change the amount of substrate cleaved compared to a control, whereby compounds that modulate the activity of the polypeptide are identified.

105. The method of claim 104, wherein the polypeptide comprises a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that:

- (a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- (b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length or along at least about 70% of the full-length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- (c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No. 16;
- (d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);
- (e) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain or a catalytically active portion thereof thereof that includes a sequence of nucleotides having at least about 80% or 85% sequence identity the the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17; and and
- (f) a sequence of nucleotides comprising degenerate codons of (a), (b), (c), (d) or (e).

106. The method of claim 104, wherein the polypeptide consists essentially of a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that:

- (a) a sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- (b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along its length or along at least about 70% of the full-length to the sequence of nucleotides set forth as nucleotides 31-729 in SEQ ID No. 5 or as SEQ ID No. 17;
- (c) a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of SEQ ID No. 16;
- (d) a sequence of nucleotides that is a splice variant of (a), (b) or (c);

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-177-

- (e) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain or a catalytically active portion thereof that includes a sequence of nucleotides having at least about 80% or 85% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID Nos. 5, 15 or 17;
- 5 and and
- (f) a sequence of nucleotides comprising degenerate codons of (a), (b), (c), (d) or (e).
107. The polypeptide of claim 14, wherein the protease domain comprises the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 16.
108. A transgenic non-human animal, comprising heterologous nucleic acid encoding a polypeptide of any of claims 1-20.
109. A probe or primer that comprises at least 14 contiguous nucleotides or modified nucleotides that are identical to a contiguous sequence of nucleotides encoding the protease domain of an MTSP9 of any of claims 1-
- 15 20; or
- comprises at least 16 contiguous nucleotides or modified nucleotides that are identical to a contiguous sequence of nucleotides encoding the protease domain of an MTSP9 of any of claims 1-20; or
- comprises at least 30 contiguous nucleotides or modified nucleotides that
- 20 are identical to a contiguous sequence of nucleotides encoding the protease domain of an MTSP9 of any of claims 1-20, wherein the antisense molecule does include nucleotides 1162-1262 of SEQ ID No. 18.

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-1-

SEQUENCE LISTING

<110> Madison, Edwin
Ong, Edgar O.

<120>NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A TRANSMEMBRANE SERINE PROTEASE 9, THE
ENCODED POLYPEPTIDES AND METHODS BASED THEREON

<130> 24745-1615

<140> Not Yet Assigned

<141> Herewith

<150>60/279,228

<151> 03-27-01

<150> 60/291,501

<151> 05-15-01

<160> 22

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3147

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<220>

<221> CDS

<222> (23)...(2589)

<223> Nucleotide sequence encoding MTSP1

<300>

<301> O'Brien, T.J. and Tanimoto, H.

<308> GenBank #AR081724

<309> 2000-08-31

<310> 5,972,616

<311> 1998-02-20

<312> 1999-10-26

<400> 1

tcaagagcgg cctcggggta cc atg ggg agc gat cgg gcc cgc aag ggc gga 52

Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly

1 5 10

ggg gcc cgc aag gac ttc ggc gcc gga ctc aag tac aac tcc cgg cac 100

Gly Gly Pro Lys Asp Phe Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His

15 20 25

gag aaa gtg aat ggc ttg gag gaa ggc gtg gag ttc ctg cca gtc aac 148

Glu Lys Val Asn Gly Leu Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn

30 35 40

aac gtc aag aag gtg gaa aag cat ggc ccg ggg cgc tgg gtg gtg ctg 196

Asn Val Lys Lys Val Glu Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu

45 50 55

gca gcc gtg ctg atc ggc ctc ctc ttg gtc ttg ctg ggg atc ggc ttc 244

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-2-

Ala Ala Val Leu Ile Gly Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe	
60 65 70	
ctg gtg tgg cat ttg cag tac cgg gac gtg cgt gtc cag aag gtc ttc	292
Leu Val Trp His Leu Gln Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe	
75 80 85 90	
aat gcc tac atg agg atc aca aat gag aat ttt gtg gat gcc tac gag	340
Asn Gly Tyr Met Arg Ile Thr Asn Glu Asn Phe Val Asp Ala Tyr Glu	
95 100 105	
aac tcc aac tcc act gag ttt gta agc ctg gcc agc aag gtg aag gac	388
Asn Ser Asn Ser Thr Glu Phe Val Ser Leu Ala Ser Lys Val Lys Asp	
110 115 120	
gcg ctg aag ctg ctg tac agc gga gtc cca ttc ctg ggc ccc tac cac	436
Ala Leu Lys Leu Leu Tyr Ser Gly Val Pro Phe Leu Gly Pro Tyr His	
125 130 135	
aag gag tgg gct gtg acg gcc ttc agc gag ggc agc gtc atc gcc tac	484
Lys Glu Ser Ala Val Thr Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr	
140 145 150	
tac tgg tct gag ttc agc atc cgg cag cac ctg gtg gag gag gcc gag	532
Tyr Trp Ser Glu Phe Ser Ile Pro Gln His Leu Val Glu Glu Ala Glu	
155 160 165 170	
cgc gtc atg gcc gag gag cgc gta gtc atg ctg ccc ccg cgg gcg cgc	580
Arg Val Met Ala Glu Glu Arg Val Val Met Leu Pro Pro Arg Ala Arg	
175 180 185	
tcc ctg aag tcc ttt gtg gtc acc tca gtg gtg gct ttc ccc acg gac	628
Ser Leu Lys Ser Phe Val Val Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Thr Asp	
190 195 200	
tcc aaa aca gta cag agg acc cag gac aac agc tgc agc ttt gcc ctg	676
Ser Lys Thr Val Gln Arg Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Gly Leu	
205 210 215	
cac gcc cgc ggt gtg gag ctg atg cgc ttc acc acg ccc ggc ttc cct	724
His Ala Arg Gly Val Glu Leu Met Arg Phe Thr Pro Gly Phe Pro	
220 225 230	
gac agc ccc tac ccc gct cat gcc cgc tgc cag tgg gcc ctg cgg ggg	772
Asp Ser Pro Tyr Pro Ala His Ala Arg Cys Gln Trp Ala Leu Arg Gly	
235 240 245 250	
gac gcc gac tca gtg ctg agc ctc acc ttc cgc agc ttt gac ctt gcg	820
Asp Ala Asp Ser Val Leu Ser Leu Thr Phe Arg Ser Phe Asp Leu Ala	
255 260 265	
tcc tgc gac gag cgc gcc agc gac ctg gtg acg gtg tac aac acc ctg	868
Ser Cys Asp Glu Arg Gly Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asn Thr Leu	
270 275 280	
agc ccc atg gag ccc cac gcc ctg gtg cag ttg tgt gcc acc tac cct	916
Ser Pro Met Glu Pro His Ala Leu Val Gln Leu Cys Gly Thr Tyr Pro	
285 290 295	

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-3-

ccc tcc tac aac ctg acc ttc cac tcc tcc cag aac gtc ctg ctc atc Pro Ser Tyr Asn Leu Thr Phe His Ser Ser Gln Asn Val Leu Leu Ile 300 305 310	964
aca ctg ata acc aac act gag cgg cgg cat ccc ggc ttt gag gcc acc Thr Leu Ile Thr Asn Thr Glu Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr 315 320 325 330	1012
ttc ttc cag ctg cct ags atg agc agc tgt gga ggc cgc tta cgt aaa Phe Phe Gln Leu Pro Arg Met Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys 335 340 345	1060
gcc cag ggg aca ttc aac agc ccc tac tac cca ggc cac tac cca ccc Ala Gln Gly Thr Phe Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro 350 355 360	1108
aac att gac tgc aca tgg aac att gag gtg ccc aac aac cag cat gtg Asn Ile Asp Cys Thr Trp Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val 365 370 375	1156
aag gtg agc ttc aaa ttc ttc tac ctg ctg gag ccc ggc gtg cct gcg Lys Val Ser Phe Lys Phe Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Gln 380 385 390	1204
gcc acc tgc ccc aag gac tac gtg gag atc aat ggg gag aaa tac tgc Gly Thr Cys Pro Lys Asp Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys 395 400 405 410	1252
gga gag agg tcc cag ttc gtc gtc acc agc aac agc aac aag atc aca Gly Glu Arg Ser Gln Phe Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr 415 420 425	1300
gtt cgc ttc cac tca gat cag tcc tac acc gac acc ggc ttc tta gct Val Arg Phe His Ser Asp Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala 430 435 440	1348
gaa tac ctc tcc tac gac tcc agt gac cca tgc cgc ggg cag ttc acg Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr 445 450 455	1396
tgc cgc acg ggg cgg tgt atc cgg aag gag ctg cgc tgt gat ggc tgg Cys Arg Thr Gly Arg Cys Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp 460 465 470	1444
gcc gac tgc acc gac cac agc gat gag ctc aac tgc agt tgc gac gcc Ala Asp Cys Thr Asp His Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala 475 480 485 490	1492
ggc cac cag ttc acg tgc aag aac aag ttc tgc aag ccc ctc ttc tgg Gly His Gln Phe Thr Cys Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp 495 500 505	1540
gtc tgc gac agt gtg aac gac tgc gga gac aac agc gac gag cag ggg Val Cys Asp Ser Val Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly 510 515 520	1588
tgc agt tgt cgg gcc cag acc ttc agg tgt tcc aat ggg aag tgc ctc Cys Ser Cys Pro Ala Gln Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu 525 530 535	1636

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-4-

tcg aaa agc cag cag tgc aat ggg aag gac gac tgt ggg gac ggg tcc Ser Lys Ser Gln Gln Cys Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser 540 545 550	1684
gac gag gcc tcc tgc ccc aag gtg aac gtc gtc act tgt acc aaa cac Asp Glu Ala Ser Cys Pro Lys Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His 555 560 565 570	1732
acc tac cgc tgc ctc aat ggg ctc tgc ttg agc aag ggc aac cct gag Thr Tyr Arg Cys Leu Asn Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu 575 580 585	1780
tgt gac ggg aag gag gac tgt agc gac ggc tca gat gag aag gac tgc Cys Asp Gly Lys Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys 590 595 600	1828
gac tgt ggg ctg cgg tca ttc acg aga cag gct cgt gtt gtt ggg ggc Asp Cys Gly Leu Arg Ser Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly 605 610 615	1876
acg gat gcg gat gag ggc gag tgg ccc tgg cag gta agc ctg cat gct Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala 620 625 630	1924
ctg ggc cag ggc cac atc tgc ggt gct tcc ctc atc tct ccc aac tgg Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp 635 640 645 650	1972
ctg gtc tct gcc gca cac tgc tac atc gat gac aga gga ttc agg tac Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr 655 660 665	2020
tca gac ccc acg cag tgg acg gcc ttc ctg ggc ttg cac gac cag agc Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser 670 675 680	2068
cag cgc agc gcc cct ggg gtg cag gag cgc agg ctc aag cgc atc atc Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile 685 690 695	2116
tcc cac ccc ttc ttc aat gac ttc acc ttc gac tat gac atc gog ctg Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu 700 705 710	2164
ctg gag ctg gag aaa cgg gca gag tac agc tcc atg gtg cgg ccc atc Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile 715 720 725 730	2212
tgc ctg cgg gac gcc tcc cat gtc ttc cct gcc ggc aag gcc atc tgg Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp 735 740 745	2260
gtc acg ggc tgg gga cac acc cag tat gga ggc act ggc gcg ctg atc Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile 750 755 760	2308
ctg caa aag ggt gag atc cgc gtc atc aac cag acc acc tgc gag aac Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn	2356

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-5-

```

765              770              775
ctc ctg ccg cag cag atc acg ccg cgc atg atg tgc gtg ggc ttc ctc      2404
Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu
780              785              790

agc ggc ggc gtg gac tcc tgc cag ggt gat tcc ggg gga ccc ctg tcc      2452
Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser
795              800              805              810

agc gtg gag ggc gat ggg cgg atc ttc cag gcc ggt gtg gtg agc tgg      2500
Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp
815              820              825

gga gac ggc tgc gct cag agg aac aag cca ggc gtg tac aca agg ctc      2548
Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu
830              835              840

cct ctg ttt cgg gac tgg atc aaa gag aac act ggg gta ta ggggcgggg      2599
Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val
845              850              855

ccacccaat gtgtacacct gcggggccac ccatcgtcca cccagtggt cagcctgca      2659
ggctggagac tggaccgctg actgcaccag cgccccaga acatacactg tgaactcaat      2719
ctccagggtc ccaaatctgc ctgaaaaacc tctcgcttcc tcagcctcca aagtggact      2779
gggaggtaga aggggaggac actggtggtt ctactgaccc aactgggggc aaaggttga      2839
agacacagcc tccccgcaca gcccaaagct gggccgaggc gcgtttgtgt atatctgct      2899
ccctgtctct taaggagcag cgggaacgga gcttcggagc ctctcagtg aaggtggtgg      2959
ggctgcggga tctgggctgt ggggcccttg gcccacgctc ttgaggagc ccaggctcgg      3019
aggaccctgg aaaaacagac ggtctgagac tgaattgtt ttaccagctc ccagggtgga      3079
cttcagtggt tgtatttgtg taaatgggta aaacaattta tttcttttta aaaaaaaaaa      3139
aaaaaaaaa
3147

<210> 2
<211> 855
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 2
Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly Gly Pro Lys Asp Phe
1              5              10              15
Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His Glu Lys Val Asn Gly Leu
20              25              30
Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Val Lys Lys Val Glu
35              40              45
Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu Ala Ala Val Leu Ile Gly
50              55              60
Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Trp His Leu Gln
65              70              75              80
Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe Asn Gly Tyr Met Arg Ile
85              90              95
Thr Asn Glu Asn Phe Val Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Asn Ser Thr Glu
100              105              110
Phe Val Ser Leu Ala Ser Lys Val Lys Asp Ala Leu Lys Leu Leu Tyr
115              120              125
Ser Gly Val Pro Phe Leu Gly Pro Tyr His Lys Glu Ser Ala Val Thr
130              135              140
Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr Tyr Trp Ser Glu Phe Ser
145              150              155              160

```

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-6-

Ile Pro Gln His Leu Val Glu Glu Ala Glu Arg Val Met Ala Glu Glu
 165 170 175
 Arg Val Val Met Leu Pro Pro Arg Ala Arg Ser Leu Lys Ser Phe Val
 180 185 190
 Val Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Thr Asp Ser Lys Thr Val Gln Arg
 195 200 205
 Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Gly Leu His Ala Arg Gly Val Glu
 210 215 220
 Leu Met Arg Phe Thr Thr Pro Gly Phe Pro Asp Ser Pro Tyr Pro Ala
 225 230 235
 His Ala Arg Cys Gln Trp Ala Leu Arg Gly Asp Ala Asp Ser Val Leu
 245 250 255
 Ser Leu Thr Phe Arg Ser Phe Asp Leu Ala Ser Cys Asp Glu Arg Gly
 260 265 270
 Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asn Thr Leu Ser Pro Met Glu Pro His
 275 280 285
 Ala Leu Val Gln Leu Cys Gly Thr Tyr Pro Pro Ser Tyr Asn Leu Thr
 290 295 300
 Phe His Ser Ser Gln Asn Val Leu Leu Ile Thr Leu Ile Thr Asn Thr
 305 310 315
 Glu Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr Phe Phe Gln Leu Pro Arg
 320 325 330
 Met Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys Ala Gln Gly Thr Phe Asn
 335 340 345
 Ser Pro Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro Asn Ile Asp Cys Thr Trp
 350 355 360
 Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val Lys Val Ser Phe Lys Phe
 365 370 375
 Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala Gly Thr Cys Pro Lys Asp
 380 385 390
 Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe
 395 400 405
 Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr Val Arg Phe His Ser Asp
 410 415 420
 Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp
 425 430 435
 Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr Cys Arg Thr Gly Arg Cys
 440 445 450
 Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Thr Asp His
 455 460 465
 Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala Gly His Gln Phe Thr Cys
 470 475 480
 Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
 485 490 495
 Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gln
 500 505 510
 Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gln Gln Cys
 515 520 525
 Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
 530 535 540
 Lys Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His Thr Tyr Arg Cys Leu Asn
 545 550 555
 Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Glu Asp
 560 565 570
 Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser
 575 580 585
 Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly
 590 595 600
 Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile
 605 610 615 620

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-7-

625 Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His 635 640
 645 650 655
 Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp 660 665 670
 Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly 675 680 685
 Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn 690 695 700
 Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Lys Pro 705 710 715 720
 Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser 725 730 735
 # His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His 740 745 750
 Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile 755 760 765
 Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile 770 775 780
 Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser 785 790 795 800
 Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly 805 810 815
 Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln 820 825 830
 Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp 835 840 845
 Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val 850 855

<210> 3
 <211> 3147
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<220>
 <221> CDS
 <222> (1865)...(2590)
 <223> Nucleic acid sequence of protease domain of MISE1

<400> 3
 tcaagagcgg cctcgggggta ccatgggggag ccatcggggc cgcgaaggcg gagggggccc 60
 gaaggacttc ggccggggac tcaagtacaa ctcccgccac gagaaagtga atggcttgga 120
 ggaaggcgtg gagttcctgc cagtcaacaa cgtcaagaag gtggaaaagc atggcccggg 180
 gccctgggtg gtgctggcag ccgtgctgat cggcctcctc ttggtcttgc tggggatcgg 240
 ctctcgtgtg tggcatttgc agtaccggga cgtgcgtgtc cagaaggtct tcaatggcta 300
 catgaggatc acaaatgaga attttgtgga tgcctacgag aactccaaot ccactgagtt 360
 tgaagcctg gccagcaagg tgaaggacgc gtggaagctg ctgtacagcg gagtccact 420
 cctggggccc taccacaagg agtcggctgt gacggccttc agcgaaggca gcgtcctgc 480
 ctactactgg tctgagttca gcattccgca gcactcgtg gaggaagcgc agcgcgtcat 540
 ggccgaggag cgcgtagtta tgcctccccc gccggcgccg tccctgaagt cctttgttgt 600
 cacttcagt gtggttttcc ccacggactc caaaacagta cagaggaccc aggacaacag 660
 ctgcagcttt ggctgcacg ccgcgggtgt ggaagctgat cgcttcacca cgcggcgctt 720
 ccttgacagc cctactcccg ctcatgcccg ctgccagtgg gccctgcggg gggagcgoga 780
 ctcaagtgtg agcctcaact tccgagctt tgaccttgcg tccctgcgag agcgcgccg 840
 cgactgtgtg acggtgtaca acacccctgag cctcatggag ccccaagccc tgggtcagtt 900
 gtgtggcacc taccctccct cctacaacct gaccttccac tctctccaga acgtcctgct 960
 catcacactg ataaccaaca ctgagcgccg gcattccccc tttgaggcca ccttttcca 1020
 gctgcctagg atgagcagct gtggaggcgc cttacgtaaa gcccaaggga cattcaacag 1080

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-8-

```

ccccactac ccagggccact acccaccacaa cattgactgc acatggaaca ttgaggtgcc 1140
caacaaccag catgtgaagg tgagcttcaa atctctctac ctgctggagc ccggcgtgcc 1200
tgcggggacc tgcgccaaag actacgtgga gatcaatggg gagaaatac gcggagagag 1260
gtccaggttc gtctgcacca gcaacagcaa caagatcaca gttcgttcc actcagatca 1320
gtctacacc gacaccggtt tcttagctga atactcttc taagactcca gtgaccatg 1380
ccggggcag ttcacgtgcc gcacggggcg gtgtatccgg aaggagctgc gctgtgatgg 1440
ctggggcgac tgcaccgacc acagcgatga gctcaactgc agttgcgacg ccggccacca 1500
gttcacgtgc aagaacaagt tctgcaagcc cctctctctg gtctgogaca gtgtgaacga 1560
ctgcggagac aacagcgacg agcaggggtg cagttgtccg gcccaagact tcaggttttc 1620
caatgggaag tgcctctcga aaagccagca gtgcacatggg aaggacact gtggggacgg 1680
gtcgaagag gctctctgac ccaagtgaa cgtctgtaet tgtacaaac acacactacg 1740
ctgctcaat gggctctgct tgagcaagcg caaccctgag tgtgacggga agggagactg 1800
tagcgacggc tcagatgaga aggactgcga ctgtgggctg cgttcattca cgagacaggc 1860
tcgt gtt gtt ggg ggc acg gat gcg gat gag ggc gag tgg ccc tgg cag 1909
Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln
1 5 10 15

gta agc ctg cat gct ctg ggc cag ggc cac atc tgc ggt gct tcc ctc 1957
Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu
20 25 30

atc tct ccc aac tgg ctg gtc tct gcc gca cac tgc tac atc gat gac 2005
Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp
35 40 45

aga gga ttc agg tac tca gac ccc acg cag tgg acg gcc ttc ctg ggc 2053
Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly
50 55 60

ttg cac gac cag agc cag cgc agc gcc cct ggg gtg cag gag cgc agg 2101
Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg
65 70 75

ctc aag cgc atc atc tcc cac ccc ttc ttc aat gac ttc acc ttc gac 2149
Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp
80 85 90 95

tat gac atc gcg ctg ctg gag ctg gag aaa ccg gca gag tac agc tcc 2197
Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser
100 105 110

atg gtg cgg ccc atc tgc ctg ccg gac gcc tcc cat gtc ttc cct gcc 2245
Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala
115 120 125

ggc aag gcc atc tgg gtc acg ggc tgg gga cac acc cag tat gga ggc 2293
Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly
130 135 140

act ggc gcg ctg atc ctg caa aag ggt gag atc cgc gtc atc aac cag 2341
Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln
145 150 155

acc acc tgc gag aac ctc ctg ccg cag cag atc acg ccg cgc atg atg 2389
Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met
160 165 170 175

tgc gtg ggc ttc ctc agc ggc ggc gtg gac tcc tgc cag ggt gat tcc 2437
Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser

```

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-9-

```

180          185          190
ggg gga ccc ctg tcc agc gtg gag gcg gat ggg cgg atc ttc cag gcc 2485
Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala
195          200          205

ggt gtg gtg agc tgg gga gac ggc tgc gct cag agg aac aag cca ggc 2533
Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly
210          215          220

gtg tac aca agg ctg cct ctg ttt cgg gac tgg atc aaa gag aac act 2581
Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr
225          230          235

ggg gta tag gggccggggc caccctaaatg tgtacacctg cggggccacc 2630
Gly Val *
240

catcgctccac cccagtgtgc acgcoctgcag gctggagact ggaccgctga ctgaccagc 2690
gccccacgaa catacactgt gaactcaatc tccagggctc caaatctgcc tagaaaacct 2750
ctcgcttctc cagcctccaa agtggagctg ggaggtagaa ggggaggaca ctggtggttc 2810

tactgaccca actgggggga aaggtttgaa gacacagcct cccccccag ccccaagctg 2870
ggccgagggc cgtttgtgta tatctgcctc ccttgcctgt aaggagcagc gggaaacgag 2930
cttcggagcc tcctcagtga aggtgggagg gctgcagat ctgggtgtg gggcccttgg 2990
ggccagcctc tgaggagacc caggctcggg ggaccctgga aaaaagaggg gctcagact 3050
gaaattgttt taccagctcc cagggtggac ttcagtgtgt gtatttgtgt aaatgggtaa 3110
aacaatttat ttctttttta aaaaaaaaaa aaaaaaa 3147

<210> 4
<211> 241
<212> FAT
<213> Homo Sapien

<400> 4
Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15
Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile
20 25 30
Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp Arg
35 40 45
Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly Leu
50 55 60
His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg Leu
65 70 75 80
Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp Tyr
85 90 95
Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met
100 105 110
Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly
115 120 125
Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr
130 135 140
Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr
145 150 155
Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met Cys
160 165 170 175
Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
180 185 190

```

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-10-

Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly
 195 200 205
 Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val
 210 215 220
 Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly
 225 230 235 240
 Val

<210> 5
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Homo Sapien

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) ..(729)
 <223> Nucleotide sequence encoding MTSF9, including protease
 domain (31-729)

<400> 5
 aaa cga gtt gtt cca tta aac gtc aac aga ata gca tct gga gtc att 48
 Lys Arg Val Val Pro Leu Asn Val Asn Arg Ile Ala Ser Gly Val Ile
 1 5 10 15
 gca ccc aag gcg gcc tgg cct tgg caa gct tcc ctt cag tat gat aac 96
 Ala Pro Lys Ala Ala Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Tyr Asp Asn
 20 25 30
 atc cat cag tgt ggg gcc acc ttg att agt aac aca tgg ctt gtc act 144
 Ile His Gln Cys Gly Ala Thr Leu Ile Ser Asn Thr Trp Leu Val Thr
 35 40 45
 gca gca cac tgc ttc cag aag tat aaa aat cca cat caa tgg act gtt 192
 Ala Ala His Cys Phe Gln Lys Tyr Lys Asn Pro His Gln Trp Thr Val
 50 55 60
 agt ttt gga aca aaa atc aac cct ccc tta atg aaa aga aat gtc aga 240
 Ser Phe Gly Thr Lys Ile Asn Pro Pro Leu Met Lys Arg Asn Val Arg
 65 70 75 80
 aga ttt att atc cat gag aag tac cgc tct gca gca aga gag tac gac 288
 Arg Phe Ile Ile His Glu Lys Tyr Arg Ser Ala Ala Arg Glu Tyr Asp
 85 90 95
 att gct gtt gtg cag gtc tct tcc aga gtc acc ttt tgg gat gac ata 336
 Ile Ala Val Val Gln Val Ser Ser Arg Val Thr Phe Ser Asp Asp Ile
 100 105 110
 cgc cgg att tgt ttg cca gaa gcc tct gca tcc ttc caa cca aat ttg 384
 Arg Arg Ile Cys Leu Pro Glu Ala Ser Ala Ser Phe Gln Pro Asn Leu
 115 120 125
 act gtc cac atc aca gga ttt gga gca ctt tac tat ggt ggg gaa tcc 432
 Thr Val His Ile Thr Gly Phe Gly Ala Leu Tyr Tyr Gly Gly Glu Ser
 130 135 140

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-11-

```

caa aat gat ctc cga gaa gcc aga gtg aaa atc ata agt gac gat gtc 480
Gln Asn Asp Leu Arg Glu Ala Arg Val Lys Ile Ile Ser Asp Asp Val
145      150      155      160

tgc aag caa cca cag gtg tat gcc aat gat ata aaa cct gga atg ttc 528
Cys Lys Gln Pro Gln Val Tyr Gly Asn Asp Ile Lys Pro Gly Met Phe
165      170      175

tgt gcc gga tat atg gaa gga att tat gat gcc tgc agg ggt gat tct 576
Cys Ala Gly Tyr Met Glu Gly Ile Tyr Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser
180      185      190

ggg gga cct tta gtc aca agg gat ctg aaa gat acg tgg tat ctc att 624
Gly Gly Pro Leu Val Thr Arg Asp Leu Lys Asp Thr Trp Tyr Leu Ile
195      200      205

gga att gta agc tgg gga gat aac tgt ggt caa aag gac aag cct gga 672
Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Asn Cys Gly Gln Lys Asp Lys Pro Gly
210      215      220

gtc tac aca caa gtg act tat tac cga aac tgg att gct tca aaa aca 720
Val Tyr Thr Gln Val Thr Tyr Tyr Arg Asn Trp Ile Ala Ser Lys Thr
225      230      235      240

ggc atc taa ttcacgataa aagttaaaca aagaaagctg tatgcaggtc atatatgc 777
Gly Ile

<210> 6
<211> 242
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> MTSP9, including protease domain (11-242)

<400> 6
Lys Arg Val Val Pro Leu Asn Val Asn Arg Ile Ala Ser Gly Val Ile
1      5      10      15

Ala Pro Lys Ala Ala Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Tyr Asp Asn
20      25      30

Ile His Gln Cys Gly Ala Thr Leu Ile Ser Asn Thr Trp Leu Val Thr
35      40      45

Ala Ala His Cys Phe Gln Lys Tyr Lys Asn Pro His Gln Trp Thr Val
50      55      60

Ser Phe Gly Thr Lys Ile Asn Pro Pro Leu Met Lys Arg Asn Val Arg
65      70      75      80

Arg Phe Ile Ile His Glu Lys Tyr Arg Ser Ala Ala Arg Glu Tyr Asp
85      90      95

Ile Ala Val Val Gln Val Ser Ser Arg Val Thr Phe Ser Asp Asp Ile
100      105      110

Arg Arg Ile Cys Leu Pro Glu Ala Ser Ala Ser Phe Gln Pro Asn Leu
115      120      125

```


WO 02/077267

PCT/US02/09611

-12-

Thr Val His Ile Thr Gly Phe Gly Ala Leu Tyr Tyr Gly Gly Glu Ser
 130 135 140
 Gln Asn Asp Leu Arg Glu Ala Arg Val Lys Ile Ile Ser Asp Asp Val
 145 150 155 160
 Cys Lys Gln Pro Gln Val Tyr Gly Asn Asp Ile Lys Pro Gly Met Phe
 165 170 175
 Cys Ala Gly Tyr Met Glu Gly Ile Tyr Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser
 180 185 190
 Gly Gly Pro Leu Val Thr Arg Asp Leu Lys Asp Thr Trp Tyr Leu Ile
 195 200 205
 Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Asn Cys Gly Gln Lys Asp Lys Pro Gly
 210 215 220
 Val Tyr Thr Gln Val Thr Tyr Tyr Arg Asn Trp Ile Ala Ser Lys Thr
 225 230 235 240
 Gly Ile

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 5' end primer:

<400> 7
 ggcaagcttc ccttcagtat gataacatcc atcag 35

<210> 8
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 3' end primer

<400> 8
 aatgagatac caggtatcctt tcagatocct tg 32

<210> 9
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PCR 5' end primer

<400> 9
 cgagttgttc cattaaacgt caacagaata gc 32

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-13-

```

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR 3' end primer

<400> 10
gcatacagct ttctttgttt aacttttate gtg
33

<210> 11
<211> 9276
<212> DNA
<213> Pichia pastoris

<400> 11
agatctaaca tccaaagacg aaaggttgaa tgaacacctt ttgccatcgg acatccacag 60
gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120
tgcaaacgca ggaacctccac tctctttctc ctcaacacc accttttgca tggaaaaacc 180
agccacgtta ttgggttgga ttggagctcg ctcatccaa ttctttctat taggtacta 240
acaccatgac ttatttagcc tgtctatcct ggccccctg gggaggttca tgtttgttta 300
tttcgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360
agtgtgggt caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgt 420
gtcttggaa ctaatafgac aaaagcgtga tctcaacca gatgaactaa gtttgggtcg 480
ttgaaatgct aacggccagt tggcacaana gaaacttcca aaagtgcgca taccgtttgt 540
cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600
ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgcggaacg caaatgggga aacaccgct 660
ttttgatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720
gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aacccctact tgacagcaat 780
atataaacag aaggaaagctg cctgtcttta aacctttttt ttatcatca ttattagctt 840
actttcataa ttgcgactgg ttccaaatga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900
caacttgaga agatcaaaaa acaactaat attcgaaaga tccaaacgat gaggatttct 960
tcaattttta ctgcagtttt atttcgacga tctctcgcat tagctgcctc agtcaaacct 1020
acaacagaag atgaaacggo acaaatcccg gctgaagctg tcatcggtta ctacagatta 1080
gaaggggatt togatgttgc tgttttgoca ttttccaaca gcacaaataa cgggttattg 1140
tttataaata ctactattgc cagcattgct gctaaagaag aaggggtatc tctcgagaaa 1200
agagaggctg aagcttaact agaattccct agggcgcccg cgaatttaatt cgccttagac 1260
atgactgttc ctacgttcaa gttggcactc tacgagaaga cgggtcttgc tagattctaa 1320
tcaagaggtt gtccgaatgc catttgcctg agagatgac gcttcaatt ttgatacttt 1380
ttatttgtaa cctatatagt ataggatttt ttttgtcatt ttgtttcttc tcgacgaga 1440
ttgtctctga tcaagcctatc tcgcagctga tgaatatctt gtggtagggg ttggggaaa 1500
tcattcgagt ttgatgtttt tcttggtatt tcccactcct cttcagagta cagaagatta 1560
agtgagaagt tcgtttgtgc aagcttatcg ataaagctta atcggttagt ttatcacagt 1620
taaattgcta acgcagtcag gcaccgtgta tgaatctaa caatgcgtc atcgtcatcc 1680
tcggcacctg caccctggat gctgtaggca taggcttggg tatgcogta ctgcggggcc 1740
tcttggggga tatcgtccat tccgacgca tcggcagctc ctatggcgtg ctgctagcgc 1800
tatattgctt gatgaattt ctatgcgcac cgttctccgg agcactgtcc gacgcgtttg 1860
gcgcgcgcgc agtcctgctc gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgactatgg 1920
cgacacaccc cgtcctgttg atctatgaa tctaaatgta agttaaaatc tctaataat 1980
taaataagtc cagctttctc catcacgaac ttaacagcat tgcggtgagc atctagacct 2040
tcaacagcag ccagatccat cactgcttgg ccaatattgt ttagtccctc agggattacg 2100
tcttgtgaag tgatgaactt ctggaaggtt gcagtgttaa ctccgctgta ttgacgggca 2160
tatcgtacg ttggcaaaagt gtggttggtt ccggaggagt aatctccaca actctctgga 2220
gagtaggcac caacaaacac agatccagc tgttgtactt gatcaacata agaagaagca 2280
ttctcgattt gaaggatcaa gttgtcagga gcttactgat tggacatttc caaagcctgc 2340
tcgtagtttg caaccgatag ggttgtagag tgtgcaatac acttgcgtac aatttcaacc 2400
cttggcaact gcacagcttg gttgtgaaca gcatcttcaa ttctggcaag ctcttgtct 2460
gtcatatcga cagccaacag aatcacctgg gaatcaatac catgttcagc ttgagacaga 2520

```

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-14-

```

aggtctgagg caacgaatac tggatcagcg tattatcag caataactag aactcagaa 2580
ggccacagcag gcatgtcaat actacacagg gctgatgtgt catlittgaac catcaccttg 2640
gcagcagtaaa ggaactgggt tccctggaca aabattttgt cacacttagg aacagtttct 2700
gttccttaag ccatagcagc tactgctcgt ggcctcctcg ctacacagat acacttagca 2760
ccaaacttgt gggcaacgta gatgacttct ggggttaagg taccatocct cttagtgga 2820
gatgcaaaaa caatttcttt gcaacacgca actttggcag gaacacccag catcagggaa 2880
gtggaaggca gaattgcggt tccacacgga atatagaggc caactttctc aatagggtctt 2940
gcacaaacag agcagactac accaggggcaa gtctcaactt gcaacgtctc cgttagttga 3000
gcttcacgga atttcctgac gttacttata gagagatcaa tggctctctt aacgttatct 3060
ggcaatttga taagtctctc tgggaaggga gcttctaaac cagggtgctt caaaggacct 3120
ccatcaaaact tggcagttag ttctaaagg gotttctcac catlittgacg aacatttctg 3180
acaattgggt tgaactaatt cataactctgt tccgttttct ggataggacg acgaaggcca 3240
tcttcaattt cttgtgagga ggccttagaa acgtcaattt tgcacaattc aatacagact 3300
tcagaaggga cttctttagg ttggattctt tctttagggt gttccttggt gtatcctggc 3360
ttggcatctc ctttcttctt agtgaacttt agggacttca tatccagggt tctctccacc 3420
tcgtccaaag tcacacgcta cttggccact ctaactaatg caaaataaaa taagtccagca 3480
catctccagg ctatactctc cttggattta gttcttgcaa gttcatcagc ttctccctca 3540
atcttagcgt tcaacaasac tctctcttca aataacogtt tggataaaga accctctgga 3600
gcattgctct taogattcca caagttggct tccatggctc taagaccctt tgaattggca 3660
aaacaggaag tgcgttccaa gtgacagaaa ccaacacctg tttgttcaac cacaatttc 3720
aagcagctct catcacatc caattcgata ccagcaact tttgattgc tccagtgta 3780
gcacctttat accacaasac gtgacagcga gattggtaga tccagtttg tgccttata 3840
gcctccggaa tagactttt ggacagtagc accaggccca acagtaatt agaaagatca 3900
gcacacaaag tagtgaatag accatcgggg cggtcagtag tcaagaagc caacaaaatt 3960
tcaotgacag ggaactttt gacacttca gaaggtcgtt altcagtagt caattgcca 4020
gcatacaata tggggattat accagaagca acagtggag tcacatctac caactttggt 4080
gtctcagaaa agcactaaac agttctacta ccgcattag tgaactttt caaatggccc 4140
agtgggaag aaaaaggcac agcgatacta gcattagcgg gcaaggatgc aactttatca 4200
accagggtcc tatagataac cctagcgctt gggatcatcc tttggcaaac tcttctgccc 4260
aaacttaggt ccaaaatcac ttcatgata ccattattgt acaacttgag caagttgtcg 4320
atcagctcct caaattgggt cctctgaacg gatgactcaa cttgcaactt aactggaagc 4380
tcagtcgatt gaggtaactt gatcaggttg tgcagctggg cagcagcata gggaaacacg 4440
gcttttcta ccaaaactca ggaatttata aactctgcaa cacttgcta tgcaggtgag 4500
aagggaatg tcatacttga agtcggacag tgagtgtagt cttgagaaat tctgaagccg 4560
tatttttatt atcagtgagt cagtcacacg gagatcctct acgcccgaag catcgtggcc 4620
gacctgcagg gggggggggg gcgctgaggt ctgctcctgt aagaaggtgt tgcctgactc 4680
taccaggcct gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccagc gttgatgaga 4740
gctttgtgt aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt gctttgccc ggaacggtct 4800
gogtbtctgg gaagatcggt gatctgacct ttcaactcag caaaagtctg atttatccaa 4860
caaaagccgc gtccgtcaa gtacgttaa tgccttgcaa gttttaac caatttcaa 4920
atcttgatta gaaaaactca tggagcatca aatgaaactg caattttatc atatcaggat 4980
tatcaatacc atatttttga aaaaacgctt tctgtaatga aggagaaaac tccacaggagc 5040
agttccatag gatggcaaga tccgtgtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa 5100
tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgaagaa tccacttag 5160
tgacagctga atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcac ttctttocag actlgttcaa 5220
caggccagcc attagctcgt tcatcaaaat cactcgatc aaccaaacog ttatcattc 5280
gtgalltggc ctgagcaga cgaataacgc gatcgtgctt aaaaggacaa ttacaaacag 5340
gaatcgaatg caacccggcg aggaacttg ccagcgatc acaaatatt tcacctgat 5400
caggatattc ttctaatacc tggaaatgct ttttcccgcg gatcgagtg gtgagtaacc 5460
atgatcatc agagtagcgt ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattcgtca 5520
gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgtacct ttgcatgtt 5580
tcagaacaaa ctcgggcgca tggggcttcc catacaatcg atagattgic gcaactgatt 5640
gcccgacatt atcgcgagcc catltatacc catataatc agcatccatg ttggaattta 5700
atcgcggcct cgagcaagac gtttccggtt gaatatggtt catacacccc ctgtattac 5760
tgtttatgta agcagacgt ttattgttct atgatgatat atlttbatct tggcaattgt 5820
aaacatcagag altttgagac acaactggcg ttcccccoc cccctcgag gtggcatca 5880
cggcgccca cttcgcggtt gctggcgctt atatcccgca catcacgat ggggaagatc 5940
gggtcgcca cttcgcgctc atgagcgctt gtttcggcgt gggatggtg ggggccccg 6000
tggccggggg actgttgggc gccatctcct tgcattgcac attccttgog gggcggtgc 6060

```

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-15-

```

tcaacggcct caacctacta ctggggctgct tctaatagca ggagtcgcat aaggggagagc 6120
gtcagataltc tatgtttgga agtatgggaa tggtagalacc cgcattctctc agtgccttga 6180
ggctctcttat cagatctatgc ccaactaaag caacccggagg agggagatttc atggtaaatt 6240
tcctctgacct ttggctcatca gttagactcga actgtgagac tatctcgggtt atgacagcag 6300
aaatgtccttt cttggagaca gtaaatgaag tcccaccaat aaagaaatcc ttgttatcag 6360
gaacaaacttt cttgttttoga acttttttcgg tgccttgaac tataaaatgt agagtggata 6420
tgtcgggttag gaatggagcg ggcaaatgct tacctttcgg accttcaaga ggtatgtagg 6480
gtttgtagat actgatgcca acttcaagtga caacgtttgt alitcgttca aacatttcog 6540
aatccagaga aatcaaaagt gtttgtctac tattgatcca agccagtgcg gttctgaaac 6600
tgacaatagt gtgctcctgt tttagagta cctttgtatg aataaatctta gttcttgatc 6660
taaaataatct tgacgagcca aggcgataaa taoccaaact taanaactctt ttaaaacttt 6720
aaaaggacaa gtatgtctgc ctgtattaaa ccccaaatca gctcgtagtc tgatcctcat 6780
caacttgagg ggcaactatct tgttttagag aaatttgcgg agatgcgata toagaaaaa 6840
ggtacgtctga ttttaaacgt gaaattttat tcaagatctc tgccctcgcc gtttcggtga 6900
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccgggagag gtcaacagctt gtcgtgaagc 6960
ggatgcgggg agcagacaag cccgtcagggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 7020
cgcagccatg acccagtcac gtagcagtag cggagtgtag actgccttaa ctatgcggca 7080
tcagagcaga ttgtactgag agtgcaaat atcggtgtgt aataaacgca cagatcggt 7140
aggagaatat accgcacag ggcgtcttcc gcttctctgc tcactgactc gctgcgtctc 7200
gtcgttccgg gaagcgcagc ggtatcagct cactcaaaag cggtaatac gttatccaca 7260
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tagacaaaag gccagcaaaa gccaggaac 7320
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggctgttttc cataggctcc gcccccctga cgagcatcac 7380
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccggacag gactataaag ataccaggcg 7440
tttcccctgt gaagctcctt cgtgcctctt cctgttccga cctgcgcgtt tacccggatac 7500
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg cgcgtttctc aatgtcacg ctgtaggtat 7560
ctcagttcgg ttgaggtcgt tgcgtccaaag ctgggtctgt tgacggaacc cccgtctag 7620
cccgcacgct cgccttctat cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 7680
ttatgccacc tggcagcagc cactggtaac aggtattaga gagcagagta tctaggcggt 7740
gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac tacggtcata ctagaaggac agtatttgg 7800
atctgcgctc tgcgtgaagc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccgc 7860
aaacaaacca ccgctggtag cgttgggttt ttgttttga accagcagat taacggcaga 7920
aaaaaaggat ctcaagaaga tcttltgac ttltctacgg ggtctgagc toagtggaa 7980
gaaaactcac gtaagggtat ttgtgtatg agattataaa aaagatctt caactagatc 8040
cttttaaatc aaaaatgaag tttaaatca acttaagta tatatgagta aacttggtct 8100
gacagttacc aatgtctaact cagtgaagca cctatctcag cgtatcgtct atttcttca 8160
tccatagtgt cctgaactcc cgtcgtgtag ataactacga tacggggagg ebtaccatct 8220
ggcccccagt ctgcaatgat accgcagac ccacgctcac cggctccaga ttatcagca 8280
ataaaccagc cagccgggaag ggcgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc 8340
atccagttca ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gtcgcgcagt taatagtgtg 8400
cgtaacgttg ttgcactgc tgcagcact gtaggtgac gctcgtcgt tctgtatggt 8460
tcattcagct ccggttccca acgatcaagg caggttacct gatccccc atgttgcaaa 8520
aaagcgttta gctcctcgg tctcctcagc gttgtcagaa gtaagtggc ccgagtggt 8580
tcaactaalgg ttatggcagc actgcaaat tctcttactg tcatgccatc cgttaagtgc 8640
ttttctgtga cgtgtgagta ctcaaccaag tcttctctag aatagtgtat cggcgagccg 8700
agttgtctct gcccgcgctc aacacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa 8760
gtgctcatca ttggaaaaag ttcttcgggg cgaaaaactct caaggatctt accgctgttg 8820
agatcagtt cgtatgaac cactcgtgca ccaactgat cttcagatc ttttacttcc 8880
accgcgttt ctgggtgagc aaaaacagga cggcaaaaaa gggatataag 8940
cgagcaaggca aatgttgaat actcatactc ttcttttttc aatattatrg aagcatttat 9000
caggyttatc gctcctagag cggatacata ttgaaatga tttagaaaaa taacaaaaa 9060
ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagt ccaactgacg tctaagaaac cattattatc 9120
atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acagggccct ttctgtctta agaattaat 9180
ctcatgtttg acagettatc atcgataagc tgactcatgt tggattgtg aaatagacgc 9240
agatcgggaa cactgaaaaa taacagttat tattcgt 9276

```

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-16-

<213> MTSP9 region adjacent to and including the cleavage site starting the protease domain (Arg+Ile)

<400> 12
Arg Val Val Pro Leu Asn Val Asn Arg Ile Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 13
tctctcgaga aaagaatagc atctggagtc attgcaccc 39

<210> 14
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
agaggcttct ggcaaaactaa tcggcgatg tc 32

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Pichia protease cleavage site
<400> 15

Lys Arg Ile Ala Ser Gly Val Ile Ala Pro Lys
1 5 10

<210> 16
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<223> Protease domain of MTSP9 (1-232)

<400> 16

Ile Ala Ser Gly Val Ile Ala Pro Lys Ala Ala Trp Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15

Ser Leu Gln Tyr Asp Asn Ile His Gln Cys Gly Ala Thr Leu Ile Ser
20 25 30

Asn Thr Trp Leu Val Thr Ala Ala His Cys Phe Gln Lys Tyr Lys Asn
35 40 45

Pro His Gln Trp Thr Val Ser Phe Gly Thr Lys Ile Asn Pro Pro Leu

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-17-

```

      50              55              60
Met Lys Arg Asn Val Arg Arg Phe Ile Ile His Glu Lys Tyr Arg Ser
65              70              75              80
Ala Ala Arg Glu Tyr Asp Ile Ala Val Val Gln Val Ser Ser Arg Val
      85              90              95
Thr Phe Ser Asp Asp Ile Arg Arg Ile Cys Leu Pro Glu Ala Ser Ala
100              105              110
Ser Phe Gln Pro Asn Leu Thr Val His Ile Thr Gly Phe Gly Ala Leu
115              120              125
Tyr Tyr Gly Gly Glu Ser Gln Asn Asp Leu Arg Glu Ala Arg Val Lys
130              135              140
Ile Ile Ser Asp Asp Val Cys Lys Gln Pro Gln Val Tyr Gly Asn Asp
145              150              155              160
Ile Lys Pro Gly Met Phe Cys Ala Gly Tyr Met Glu Gly Ile Tyr Asp
165              170              175
Ala Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Thr Arg Asp Leu Lys
180              185              190
Asp Thr Trp Tyr Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Asn Cys Gly
195              200              205
Gln Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Gln Val Thr Tyr Tyr Arg Asn
210              215              220
Trp Ile Ala Ser Lys Thr Gly Ile
225              230

<210> 17
<211> 1257
<212> DNA
<213> Homo sapien

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1257)
<223> Nucleotide sequence encoding full-length MTSP9

<400> 17
atg atg tat cgg aca gta gga ttt ggc acc cga agc aga aat ctg aag      48
Met Met Tyr Arg Thr Val Gly Phe Gly Thr Arg Ser Arg Asn Leu Lys
1              5              10              15
cca tgg atg att gcc gtt ctc att gtg ttg tcc ctg aca gtg gtg gca      96
Pro Trp Met Ile Ala Val Leu Ile Val Leu Ser Leu Thr Val Val Ala
20              25              30
gtg acc ata ggt ctc ctg gtt cac ttc cta gta ttt gac caa aaa aag      144
Val Thr Ile Gly Leu Leu Val His Phe Leu Val Phe Asp Gln Lys Lys
35              40              45

```

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-18-

gag tac tat cat gcc tcc ttt aaa att tta gat oca caa atc aat aac	192
Glu Tyr Tyr His Gly Ser Phe Lys Ile Leu Asp Pro Gln Ile Asn Asn	
50 55 60	
aat ttc gga caa agc aac aca tat caa ctt aag gac tta cga gag acg	240
Asn Phe Gly Gln Ser Asn Thr Tyr Gln Leu Lys Asp Leu Arg Glu Thr	
65 70 75 80	
acc gaa aat ttg gtg gat gag ata ttt ata gat tca gcc tgg aag aaa	288
Thr Glu Asn Leu Val Asp Glu Ile Phe Ile Asp Ser Ala Trp Lys Lys	
85 90 95	
aat tat atc aag aac caa gta gtc aga ctg act oca gag gaa gat ggt	336
Asn Tyr Ile Lys Asn Gln Val Val Arg Leu Thr Pro Glu Glu Asp Gly	
100 105 110	
gtg aaa gta gat gtc att atg gtg ttc cag ttc oca tct act gaa caa	384
Val Lys Val Asp Val Ile Met Val Phe Gln Phe Pro Ser Thr Glu Gln	
115 120 125	
agg gca gta aga gag aag aaa atc caa agc atc tta aat cag aag ata	432
Arg Ala Val Arg Glu Lys Lys Ile Gln Ser Ile Leu Asn Gln Lys Ile	
130 135 140	
agg aat tta aga gcc ttg cca ata aat gcc tca tca gtt caa gtt aat	480
Arg Asn Leu Arg Ala Leu Pro Ile Asn Ala Ser Ser Val Gln Val Asn	
145 150 155	
gca atg agc tca tca aca ggg gag tta act gtc caa gca agt tgt ggt	528
Ala Met Ser Ser Ser Thr Gly Glu Leu Thr Val Gln Ala Ser Cys Gly	
165 170 175	
aaa cga gtt gtt cca tta aac gtc aac aga ata gca tct gga gtc att	576
Lys Arg Val Val Pro Leu Asn Val Asn Arg Ile Ala Ser Gly Val Ile	
180 185 190	
gca ccc aag gcg gcc tgg cct tgg caa gct tcc ctt cag tat gat aac	624
Ala Pro Lys Ala Ala Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Tyr Asp Asn	
195 200 205	
atc cat cag tgt ggg gcc acc ttg att agt aac aca tgg ctt gtc act	672
Ile His Gln Cys Gly Ala Thr Leu Ile Ser Asn Thr Trp Leu Val Thr	
210 215 220	
gca gca cac tgc ttc cag aag tat aaa aat oca cat caa tgg act gtt	720
Ala Ala His Cys Phe Gln Lys Tyr Lys Asn Pro His Gln Trp Thr Val	
225 230 235 240	
agt ttt gga aca aaa atc aac cct ccc tta atg aaa aga aat gtc aga	768
Ser Phe Gly Thr Lys Ile Asn Pro Pro Leu Met Lys Arg Asn Val Arg	
245 250 255	
aga ttt att atc cat gag aag tac cgc tct gca gca aga gag tac gac	816
Arg Phe Ile Ile His Glu Lys Tyr Arg Ser Ala Ala Arg Glu Tyr Asp	
260 265 270	
att gct gtt gtg cag gtc tct tcc aga gtc acc ttt tgg gat gac ata	864
Ile Ala Val Val Gln Val Ser Ser Arg Val Thr Phe Ser Asp Asp Ile	
275 280 285	

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-19-

```

cgc cgg att tgt ttg cca gaa gcc tct gca tcc ttc caa cca aat ttg      912
Arg Arg Ile Cys Leu Pro Glu Ala Ser Ala Ser Phe Gln Pro Asn Leu
290                               295                               300

act gtc cac atc aca gga ttt gga gca ctt tac tat ggt ggg gaa tcc      960
Thr Val His Ile Thr Gly Phe Gly Ala Leu Tyr Tyr Gly Gly Glu Ser
305                               310                               315                               320

caa aat gat ctc cga gaa gcc aga gtg aaa atc ata agt gac gat gtc      1008
Gln Asn Asp Leu Arg Glu Ala Arg Val Lys Ile Ile Ser Asp Asp Val
325                               330                               335

tgc aag caa cca cag gtg tat ggc aat gat ata aaa cct gga atg ttc      1056
Cys Lys Gln Pro Gln Val Tyr Gly Asn Asp Ile Lys Pro Gly Met Phe
340                               345                               350

tgt gcc gga tat atg gaa gga att tat gat gcc tgc agg ggt gat tct      1104
Cys Ala Gly Tyr Met Glu Gly Ile Tyr Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser
355                               360                               365

ggg gga cct tta gtc aca agg gat ctg aaa gat acg tgg tat ctc att      1152
Gly Gly Pro Leu Val Thr Arg Asp Leu Lys Asp Thr Trp Tyr Leu Ile
370                               375                               380

gga att gta agc tgg gga gat aac tgt ggt caa aag gac aag cct gga      1200
Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Asn Cys Gly Gln Lys Asp Lys Pro Gly
385                               390                               395                               400

gtc tac aca caa gtg act tat tac cga aac tgg att gct tca aaa aca      1248
Val Tyr Thr Gln Val Thr Tyr Tyr Arg Asn Trp Ile Ala Ser Lys Thr
405                               410                               415

ggc atc taa
Gly Ile *                               1257

```

<210> 18
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

```

<400> 18
Met Met Tyr Arg Thr Val Gly Phe Gly Thr Arg Ser Arg Asn Leu Lys
1                               5                               10                               15
Pro Trp Met Ile Ala Val Leu Ile Val Leu Ser Leu Thr Val Val Ala
20                               25                               30
Val Thr Ile Gly Leu Leu Val His Phe Leu Val Phe Asp Gln Lys Lys
35                               40                               45
Glu Tyr Tyr His Gly Ser Phe Lys Ile Leu Asp Pro Gln Ile Asn Asn
50                               55                               60
Asn Phe Gly Gln Ser Asn Thr Tyr Gln Leu Lys Asp Leu Arg Glu Thr
65                               70                               75                               80
Thr Glu Asn Leu Val Asp Glu Ile Phe Ile Asp Ser Ala Trp Lys Lys
85                               90                               95
Asn Tyr Ile Lys Asn Gln Val Val Arg Leu Thr Pro Glu Glu Asp Gly
100                               105                               110
Val Lys Val Asp Val Ile Met Val Phe Gln Phe Pro Ser Thr Glu Gln

```


WO 02/077267

PCT/US02/09611

-20-

```

115      120      125
Arg Ala Val Arg Glu Lys Lys Ile Gln Ser Ile Leu Asn Gln Lys Ile
130      135      140
Arg Asn Leu Arg Ala Leu Pro Ile Asn Ala Ser Ser Val Gln Val Asn
145      150      155      160
Ala Met Ser Ser Ser Thr Gly Glu Leu Thr Val Gln Ala Ser Cys Gly
165      170      175
Lys Arg Val Val Pro Leu Asn Val Asn Arg Ile Ala Ser Gly Val Ile
180      185      190
Ala Pro Lys Ala Ala Trp Pro Trp Gln Ala Ser Leu Gln Tyr Asp Asn
195      200      205
Ile His Gln Cys Gly Ala Thr Leu Ile Ser Asn Thr Trp Leu Val Thr
210      215      220
Ala Ala His Cys Phe Gln Lys Tyr Lys Asn Pro His Gln Trp Thr Val
225      230      235      240
Ser Phe Gly Thr Lys Ile Asn Pro Pro Leu Met Lys Arg Asn Val Arg
245      250      255
Arg Phe Ile Ile His Glu Lys Tyr Arg Ser Ala Ala Arg Glu Tyr Asp
260      265      270
Ile Ala Val Val Gln Val Ser Ser Arg Val Thr Phe Ser Asp Asp Ile
275      280      285
Arg Arg Ile Cys Leu Pro Glu Ala Ser Ala Ser Phe Gln Pro Asn Leu
290      295      300
Thr Val His Ile Thr Gly Phe Gly Ala Leu Tyr Tyr Gly Gly Glu Ser
305      310      315      320
Gln Asn Asp Leu Arg Glu Ala Arg Val Lys Ile Ile Ser Asp Asp Val
325      330      335
Cys Lys Gln Pro Gln Val Tyr Gly Asn Asp Ile Lys Pro Gly Met Phe
340      345      350
Cys Ala Gly Tyr Met Glu Gly Ile Tyr Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser
355      360      365
Gly Gly Pro Leu Val Thr Arg Asp Leu Lys Asp Thr Trp Tyr Leu Ile
370      375      380
Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Asn Cys Gly Gln Lys Asp Lys Pro Gly
385      390      395      400
Val Tyr Thr Gln Val Thr Tyr Tyr Arg Asn Trp Ile Ala Ser Lys Thr
405      410      415
Gly Ile

```

<210> 19
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 19
 aatgagatcac cacgtatctt tcagatccct tg

32

<210> 20
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

WO 02/077267

PCT/US02/09611

-21-

<400> 20
atgagaagta ccgctctgca gcaagagag 29

<210> 21
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 21
attcgcgcc gcttagatgc ctgtttttga agcaat 36

<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 22
gacatacgcc ggattagttt gccagaagcc tct 33

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077267 A3(51) International Patent Classification⁷: C12N 9/64,
15/57, 15/74, 15/79, C12Q 1/37

(21) International Application Number: PCT/US02/09611

(22) International Filing Date: 27 March 2002 (27.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/279,228 27 March 2001 (27.03.2001) US
60/291,501 15 May 2001 (15.05.2001) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier applications:US 60/279,228 (CIP)
Filed on 27 March 2001 (27.03.2001)
US 60/291,501 (CIP)
Filed on 15 May 2001 (15.05.2001)(71) Applicant (for all designated States except US): DEN-
DREON SAN DIEGO LLC [US/US]; 3030 Science Park
Road, San Diego, CA 92121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MADISON, Edwin,
L. [US/US]; 11005 Cedarcrest Way, San Diego, CA 92121
(US). ONG, Edgar, O. [CA/US]; 10738 Glendover Lane,
San Diego, CA 92126 (US).(74) Agents: SEIDMAN, Stephanie, L. et al.; Heller Ehrman
White & McAuliffe LLP, 4350 La Jolla Village Drive, San
Diego, CA 92122-1246 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH,
GM, GN, GU, HT, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Declarations under Rule 4.17:

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designa-
tions AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GU, HT, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PH,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent
(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designa-
tions AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,
EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GU, HT, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PH,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent
(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
18 September 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A TRANSMEMBRAN SERINE PROTEASE 9, THE ENCODED
POLYPEPTIDES AND METHODS BASED THEREON(57) Abstract: Provided herein are type II transmembrane serine protease 9 (MTSP9) polypeptides. Zymogen and activated forms of
these polypeptides as well as single and two chain forms of the protease domain are also provided. Methods using the polypeptides
to identify compounds that modulate the protease activity of an MTSP9 are provided.

WO 02/077267 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09611
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 9/64, 15/57, 15/74, 15/79; C12Q 1/37 US CL : 435/23, 69.1, 226, 252.3, 320.1; 536/23.2 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) U.S. : 435/23, 69.1, 226, 252.3, 320.1; 536/23.2 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 Confirmation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P --- Y,P	US 6,365,391 B1 (WEBSTER et al) 02 April 2002 (02.04.2002), SEQ IDs NOs: 1 & 2, Figures 1A, 1B & 2A-2C, cols. 8-20, 24-31, & 32-39, and claims 1-12.	1-8, 10-17, 20-36, 38-42, 50-55, 59, 60, 62, 63, 65-70, & 104-107. ----- 61, 64, 71, & 72.
X,P --- Y,P	WO 02/26947 A2 (PE CORPORATION (NY)) 04 April 2002 (04.04.2002), SEQ IDs NOs: 1 & 2, pages 12-28, 31-37, & 43-50.	1-8, 10-17, 20-36, 38-42, 50-55, 59, 60, 62, 63, 65-70, & 104-107. ----- 61, 64, 71, & 72.
X,P --- Y,P	WO 01/55441 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 02 August 2001 (02.08.2001), SEQ IDs NOs: 69 & 213, and paragraphs 14-38, 52-85, 86-146, 155-183, 353-355, 699-703, 712, 713, 718-722, 1094-1102, & 1211-1215.	1-8, 10-17, 20-36, 38-42, 50-55, 65-69, & 104-108. ----- 59-64, 71 & 72.
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *T* Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to interpret the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *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 "B" earlier application or patent published on or after the international filing date *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 "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) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *&* document number 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: 17 July 2003 (17.07.2003)		Date of mailing of the international search report: 24 JUL 2003
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 William W. Moore Telephone No. (703)308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US02/09611
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P --- Y,P	WO 01/75067 A2 (HYSEQ INC.) 11 October 2001 (11.10.2001), SEQ ID NO:58151 and pages 2-20, 24-34, 37, 38, 54-57, & 89-96.	1-17, 20-36, 38-42, 50-55, 62, 63, 65-69, & 104-107. ----- 59-61, 64, 71, & 72.
X,P --- Y,P	WO 02/06453 A2 (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 24 January 2002 (24.01.2002), SEQ IDs NOs: 1 & 2, Figures 1 & 2, and pages 1-26, 33-42, & 55-58.	1-7, 10-17, 20-36, 38-42, 50-55, 59, 60, 65-69, & 104-106. ----- 61-64, 71, & 72.
X,P --- Y,P	WO 02/00860 A2 (SUGEN INC.) 03 January 2002 (03.01.2002), SEQ IDs NOs: 50 & 109, Figures 1RR & 2Q, and pages 10-30, 36-42, 81-88, 188, 189, 210, & 226.	1-7, 10-17, 20-36, 38-42, 50-55, 65-69, & 104-106. ----- 59-64, 71, & 72.
Y,P	WO 01/27624 A2 (SUPERARRAY, INC.) 19 April 2001 (19.04.2001), pages 9-39 & 41-54.	59-61, 71, & 72.
Y,P	US 2002/0019006 A1 (YUAN et al) 14 February 2002 (14.02.2002), paragraphs 0009-0024 & 0033-0060 and Figures 1-3.	62-64.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09611
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.: 97 and 98 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: Please See Continuation Sheet
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.: 1-36, 38-42, 50-55, 59-61, 62-64 in part, 65-72 and 104-107
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

PCT/US02/09611

Continuation of Box I Reason 2:

Claims 97 and 98 state a dependency from claim 96. Yet claim 96 describes no "biological sample" which would permit the operation of a method of claim 97, thus claim 97 finds no antecedent basis in claim 96 that allows a cognizable construction of claim 97. Claim 98 excludes both forms of test components of claim 96 by requiring that "both forms consist essentially of the protease domain", thus claim 98 finds no antecedent basis in claim 96 that allows a cognizable construction of claim 98.

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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-36, 38-42, 50-55, 59-61, 62-64 in part, 65-72, and 104-107, drawn to a first product, a MTSP9 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof, as well as conjugates and solid supports comprising same, to a first method of making the product utilizing a nucleic acid encoding a MTSP9 or catalytic domain thereof and vectors and host cells comprising said nucleic acid and solid supports comprising same, and to a first method of use of the first product in a method for identifying a compound capable of modulating the proteolytic activity of the first product.

Group II, claim 37, drawn to a second product, a transgenic animal, sustaining a deletion or inactivating mutation of protease-encoding gene.

Group III, claims 43 and 44, drawn to a third product, a nucleic acid molecule that is antisense to a portion of a protease-encoding gene.

Group IV, claims 45 and 109, and 62-64 in part, drawn to a fourth product, an oligonucleotide portion of a protease-encoding gene and to a solid support comprising same.

Group V, claims 46-49, drawn to a fifth product, an antibody that specifically binds to a MTSP9 polypeptide-like protease.

Group VI, claims 56-58, drawn to a sixth product, a composition comprising an inhibitor of a MTSP9 polypeptide-like protease together with either an anti-tumor or an anti-angiogenic agent.

Group VII, claims 73-78, drawn to a second use of the first product in a method for identifying a compound capable of specifically binding to a MTSP9 polypeptide-like protease.

Group VIII, claims 79-86, drawn to a third use of the first product in a method for identifying a compound capable of activating the zymogen form of a MTSP9 polypeptide-like protease.

Group IX, claims 87-92, drawn to a first use of a seventh product, an inhibitor of the activity of a MTSP9 polypeptide-like protease, or activation of its zymogen, in a method of treating or preventing neoplastic diseases including tumor initiation, growth or progression, or a malignant or pre-malignant conditions.

Group X, claims 93 and 96, drawn to a fourth use of the first product in a method for identifying a compound that binds preferentially either to a single-chain or to a two-chain form of a MTSP9 polypeptide-like protease.

Group XI, claims 94 and 95, drawn to a first method of use of an eighth, unspecified, product in detecting a neoplastic disease.

Group XII, claims 99-103, drawn to a first method of use of a ninth, unspecified, product in diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, or a malignancy, or another pathological condition.

Group XIII, claim 108, drawn to a tenth product, a transgenic animal comprising a nucleic acid sequence encoding a MTSP9 polypeptide-like protease.

The inventions listed as Group I and Groups II-VI, IX, XI-XIII 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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/09611

special technical feature of Group I, a proteolytically active MTSP9 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof is neither shared nor required in a product of Groups II-VI, IX, XI-XIII, which lack this same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group I and Groups VII, VIII, and X 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 special technical feature of the method of Group I requires a proteolytically active MTSP9 polypeptide-like protease, or catalytic domain thereof, a substrate thereof, and a compound acting directly on the protease or catalytic domain thereof, which latter component, a compound inhibitory to the MTSP9 polypeptide-like protease, or catalytic domain thereof, is not included in methods of Groups VII and VIII, or is optional in a method of Group X, and because no method of Groups VII, VIII, and X, can be practiced concurrently with a method of Group I, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group II and Groups III-XIII 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 special technical feature of Group II, a transgenic animal, which is the presence of a deletion or inactivating mutation of protease-encoding gene in its chromosomes, cannot be utilized by, or included in, a product or a method of Groups III-XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group III and Groups IV-XIII 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 special technical feature of Group III, a nucleic acid molecule which is antisense to a nucleic acid molecule encoding a proteolytically active MTSP9 polypeptide-like protease or catalytic domain, requires that it not encode such a protease, thus cannot be utilized by, or included in, a product or a method of Groups IV-XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group IV and Groups V-XIII 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 special technical feature of Group IV, an oligonucleotide portion of a protease-encoding gene, does not require that it encode a functional, proteolytically active, MTSP9 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof, thus cannot be utilized by, nor is it specifically required in, a product or a method of Groups V-XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group V and Groups VI-XIII 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 special technical feature of Group V, an antibody, is that of specifically binding to a MTSP9 polypeptide-like protease or proteolytically active MTSP9 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof, is a feature neither shared nor required in a product or a method of Groups VI-XIII, which therefore lack this same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group VI and Groups VII-XIII 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 special technical feature of Group VI, the presence in a composition of an anti-tumor or an anti-angiogenic agent, is neither shared nor required in a product or a method of Groups VII-XIII, which lack this same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group VII and Groups VIII-XIII 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 special technical feature of Group VII, a method for identifying a compound capable of specifically binding to a MTSP9 polypeptide-like protease, does not require the use of a protease substrate and does not require the inhibition of any activity of a protease, thus lacks a same or corresponding special technical feature with methods of Groups VIII and X, neither can the method of Group VII be practiced concurrently with a method of Groups IX, XI or XII, nor can it be practiced with a product of Group XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group VIII and Groups IX-XIII 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 special technical feature of Group VIII, a method for identifying a compound capable of activating the zymogen form of a MTSP9 polypeptide-like protease, does not require the use both the single-chain form of the protease and the two-chain form of the protease, thus lacks a same or corresponding special technical feature with the methods of Group X, neither can the method of Group VIII be practiced concurrently with a method of Groups IX, XI or XII, nor can it be practiced with a product of Group XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group IX and Groups X-XIII 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 special technical feature of Group IX, a method for preventing or treating a neoplastic disease, cannot be practiced concurrently with a method of Groups X-XII, nor can it be practiced with a product of Group XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/09611

The inventions listed as Group X and Groups XI-XIII 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 special technical feature of Group X, use of a MTSP9 polypeptide-like protease to identify a compound that binds preferentially either to a single-chain or to a two-chain form of a MTSP9 polypeptide-like protease, cannot be practiced concurrently with a method of Groups XI or XII, nor can it be practiced with a product of Group XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group XI and Groups XII-XIII 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 special technical feature of Group XI, a first method of use of an eighth, unspecified, product in detecting a neoplastic disease, cannot, as claimed, be practiced concurrently with a method of Group XII, nor can it be practiced with a product of Group XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Groups XII and XIII 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 special technical feature of Group XII, a first method of use of an ninth, unspecified, product in diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, or a malignancy, or another pathological condition, cannot be practiced with a product of Group XIII, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item3:

SEQ ID NO:6 searched in the A-GeneSeq 101002, PIR 73, SwissProt 40, SPTREMBL 21, and issued U.S. patent and published U.S. application amino acid sequence databases, and searched against, p2a, the N-GeneSeq 101002, GenBank, EST, and issued U.S. patent and published U.S. application nucleic acid sequence databases. Sequence comparison of SEQ ID NO:13 with SEQ ID NO:58151 of WO 01/75067 included in the document.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395 P	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 5
C 1 2 M 1/00	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/19	C 1 2 M 1/00 A	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/64	C 1 2 N 9/64 Z	
C 1 2 N 11/08	C 1 2 N 11/08	
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53 M	
// C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/566	
(C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 15/00 F	
C 1 2 R 1:84)	C 1 2 N 5/00 A	
(C 1 2 N 9/64	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:84)	C 1 2 N 1/19	
(C 1 2 Q 1/37	C 1 2 R 1:84	
C 1 2 R 1:84)	C 1 2 N 9/64 Z	
	C 1 2 R 1:84	
	C 1 2 Q 1/37	
	C 1 2 R 1:84	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(72)発明者 エドウィン・エル・マディソン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、シーダークレスト・ウェイ 1 1 0 0 5 番

(72)発明者 エドガー・オー・オン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア州サンディエゴ、グレンドローバー・レイン 1 0 7 3 8 番

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02

4B024 AA01 AA11 AA12 BA14 BA19 BA44 BA45 CA04 CA09 CA10

CA11 DA01 DA02 DA05 DA06 DA12 EA04 GA11 HA03 HA11

4B029 AA07 AA21 BB16 BB17 CC03 FA12 FA13

4B033 NA01 NA30 NB12 NB22 NB32 NC02 NC05 NC06 ND05 ND08

ND12 NG09

4B050 CC02 CC03 CC04 DD07 DD11 FF05E FF11E GG10 LL01 LL03

4B063	QA01	QA19	QQ03	QQ08	QQ36	QR16	QR58	QR72	QR77	QR82
	QS02	QX01								
4B064	AG26	AG27	CA10	CA20	DA01	DA13	DA14			
4B065	AA01X	AA72X	AA77X	AA89X	AA90X	AA93Y	AB01	AC15	BA01	BA02
	BA03	BD27	CA23	CA24	CA33	CA44	CA46			
4C084	AA02	AA03	AA07	AA13	AA17	AA20	BA35	BA44	CA53	DC32
	MA02	MA13	MA17	MA22	MA23	MA24	MA28	MA31	MA35	MA37
	MA41	MA43	MA52	MA56	MA57	MA58	MA59	MA60	MA63	MA66
	NA14	ZA362	ZB261	ZB262	ZC202					
4C085	AA13	AA15	BB22	BB33	BB34	BB35	BB36	BB37	BB41	BB43
	CC02	CC17	DD35	DD62	DD63	DD88	EE01	EE03	GG03	GG04
	GG06	GG08								
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA02	MA04	MA13	MA17	MA22
	MA23	MA24	MA28	MA31	MA35	MA37	MA41	MA43	MA52	MA56
	MA57	MA58	MA59	MA60	MA63	MA66	NA14	ZB26	ZC20	
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	CA40	CA41	DA75	DA76	DA89
	EA28	EA50	EA51							