

(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2004-504032

(P2004-504032A)

(43) 公表日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(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 4 B O 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 5 0
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	N 4 C O 8 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 264 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-512384 (P2002-512384)	(71) 出願人	593141953
(86) (22) 出願日	平成13年7月16日 (2001.7.16)		ファイザー・インク
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月14日 (2003.1.14)		アメリカ合衆国・ニューヨーク州・ニュー
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/001263		ヨーク・イースト・42nd・ストリート
(87) 国際公開番号	W02002/006492		・235
(87) 国際公開日	平成14年1月24日 (2002.1.24)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	0017387.2		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成12年7月14日 (2000.7.14)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 性的機能不全の処置用の新規なヒト可溶性分泌エンドペプチダーゼ (SEP)

(57) 【要約】

配列番号：2の新規なヒト可溶性分泌エンドペプチダーゼ (SEP) をエンコードしているポリヌクレオチド配列を記載し、およびポリペプチド配列を記載する。該ポリペプチド配列は、(a) 配列番号：1または配列番号：5のポリヌクレオチド配列から翻訳される推定のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびその変異体、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；(b) 配列番号：2のポリペプチドおよびその変異体、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；(c) NCIMB 41110のcDNAによってエンコードされたポリペプチドおよびその変異体、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；または(d) ポリペプチドであって、(i) 配列番号：1または配列番号：5のポリヌクレオチドによってエンコードされたポリペプチド、(ii) 配列番号：2のポリペプチド、または(iii) NCIMB 41110のcDNAによってエンコードされたポリペプチドに少なくとも78%の同一性を有するポリペプチドの一つまたはそれを越えるものを含む。このようなポリペプチド配列は、特に、性的機能不全、具体的には、男性勃起機能不全 (MED) または女性性的機能不全 (FSD)、好ましくは、女性性的興奮障害 (FAD) の予防および／または処置において有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたおよび／または精製されたポリヌクレオチドであって、

- (a) 配列番号：2 に示されるポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号：1 または配列番号：5 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；
- (c) NCIMB 4 1 1 1 0 中に含有される DNA によって発現されたポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチド；
- (d) (a) ～ (c) のいずれか一つのポリヌクレオチドに少なくとも 83 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；
- (e) (a) ～ (d) のいずれか一つのポリヌクレオチドにハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；
- (f) (a) ～ (e) のいずれか一つのポリヌクレオチドの相補鎖；または
- (g) (a) ～ (f) のいずれか一つのポリヌクレオチドのポリヌクレオチドフラグメント

の内の一つまたはそれを越えるものを含む上記ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

ヒト可溶性分泌エンドペプチダーゼ（ヒト SEP）をエンコードする請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

ポリペプチドまたはそのフラグメントを製造する方法であって、請求項 1 または請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換されたまたはトランスフェクションされた宿主細胞を、該ポリペプチドまたはそのフラグメントの発現に十分な条件下の培地中で培養することを含む上記方法。

【請求項 4】

SEP 活性を有するポリペプチドであって、

- (a) 配列番号：1 または配列番号：5 のポリヌクレオチド配列から翻訳される推定のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびその変異体、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；
 - (b) 配列番号：2 のポリペプチドおよびその変異体、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；
 - (c) NCIMB 4 1 1 1 0 の cDNA によってエンコードされたポリペプチドおよびその変異体、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；または
 - (d) ポリペプチドであって、(i) 配列番号：1 または配列番号：5 のポリヌクレオチドによってエンコードされたポリペプチド、(ii) 配列番号：2 のポリペプチド、または (iii) NCIMB 4 1 1 1 0 の cDNA によってエンコードされたポリペプチドに少なくとも 78 % の同一性を有するもの
- の内の一つまたはそれを越えるものを含む上記ポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のポリペプチドを阻害するまたは選択的に阻害する化合物。

【請求項 7】

医薬組成物であって、請求項 5 に記載の抗体または請求項 6 に記載の化合物および 1 種類またはそれを越える薬学的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤を含む上記医薬組成物。

【請求項 8】

製剤として用いるための請求項 5 に記載の抗体、請求項 6 に記載の化合物または請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

性的機能不全、特に、男性勃起機能不全（MED）または女性性的機能不全（FSD）の

予防および／または処置のための薬剤の製造における請求項 5 に記載の抗体または請求項 6 に記載の化合物の使用。

【請求項 10】

前記女性性的機能不全 (FSD) が女性性的興奮障害 (FSAD) である請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

患者の性的機能不全、特に、男性勃起機能不全 (MED) または女性性的機能不全 (FSD) の予防および／または処置の方法であって、該患者に治療的有效量の請求項 5 に記載の抗体または請求項 6 に記載の化合物を投与することを含む上記方法。

【請求項 12】

前記女性性的機能不全 (FSD) が女性性的興奮障害 (FSAD) である請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 4 に記載のポリペプチドを過剰発現する、過少発現するまたはその標的挿入または欠失を示すように *ex vivo* または *in vivo* で遺伝子操作された細胞。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の細胞を含む非ヒト動物。

【請求項 15】

請求項 4 に記載のポリペプチドを生じることができる受託番号 NCIMB 41110 として寄託された細胞およびそれに由来しうる変異体および突然変異体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、酵素に関する。本発明は、更に、その酵素をエンコードしているヌクレオチド配列に関する。

【0002】

詳しくは、本発明は、新規なヒト可溶性分泌エンドペプチダーゼ (SEP) をエンコードしている新規な核酸配列に関する。

本発明は、更に、疾患の診断および予防および／または処置における新規な核酸配列およびアミノ酸配列の使用に関する。

【0003】

本発明は、更に、特に、エンドペプチダーゼ活性をモジュレートしうる、好ましくは、阻害しうる、より好ましくは、選択的に阻害しうる試剤を評価するおよび／またはスクリーニングするための新規な核酸配列およびアミノ酸配列の使用に関する。

【0004】

本発明は、更に、性的機能不全、例えば、女性性的機能不全 (FSD)、特に、女性性的興奮障害 (FSAD) の予防および／または処置において有用な化合物および医薬組成物に関する。

【0005】

本発明は、また更に、FSD、特に、FSAD の予防および／または処置の方法に関する。

本発明は、更に、FSD、特に、FSAD の予防および／または処置において有用な化合物をスクリーニングする検定に関する。

【0006】

本発明は、男性性的機能不全、特に、男性勃起機能不全 (MED) の予防および／または処置において用いるための化合物および医薬組成物に関する。本明細書中で論及される男性性的機能不全とは、早発射精などの射精障害、無オルガスム症 (オルガスムに達し得ない)、または活動低下状態の性的欲求障害 (性行為への関心欠如) などの欲求障害、を含む意味である。

【0007】

10

20

30

40

50

本発明は、更に、M E Dの予防および／または処置の方法に関する。

本発明は、更に、男性性的機能不全、特に、M E Dの予防および／または処置において有用な化合物をスクリーニングする検定に関する。

【0008】

発明の背景

ヒト可溶性分泌エンドペプチダーゼ（ヒトS E P）

プロテアーゼは、タンパク質およびペプチドを、そのペプチドまたはタンパク質鎖の主鎖を形成するペプチド結合において切断する酵素のラージファミリーを形成している。プロテアーゼは、細菌からヒトまでの全ての生物において見出されている。ヒトの場合、全遺伝子の約1%（400～1000）が、プロテアーゼ酵素をエンコードしていると考えられている。それらは、発生期ポリペプチドの活性化および成熟、誤って折りたたまれた且つ損傷したタンパク質の分解、および細胞の内部および外部両方のペプチドおよびタンパク質の制御された代謝回転に関与している。それらの活性は、消化、正常な成長、内分泌機能、創傷治癒、炎症、血管新生、胚発生期の組織再造形、腫瘍転移、心臓血管疾患、神経学的疾患、および細菌、寄生生物およびウイルスの感染を含めた多数の過程に重要である。

10

【0009】

プロテアーゼは、それらの基質を切断する場所に基づいて広く分類することができる。エキソペプチダーゼには、アミノペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ、トリペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ペプチジルジペプチダーゼ、ジペプチダーゼおよびωペプチダーゼが含まれ、これらは、その基質の末端の残基を切断する。セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼおよびメタロエンドペプチダーゼが含まれるエンドペプチダーゼは、そのペプチド内の配列において切断する。

20

【0010】

亜鉛メタロプロテアーゼとして知られる重要なエンドペプチダーゼ群は、それらの触媒部位に亜鉛イオンを結合する必要条件を有することによって特徴付けられる。亜鉛メタロプロテアーゼは、クラスに細分することができ（概説については、F E B S L e t t e r s 354（1994）pp. 1-6を参照されたい）、一つのこのようなクラスは、ネプリリシン（n e p r i l y s i n）（N E P）様亜鉛メタロプロテアーゼである（F A S E B J o u r n a l, V o l 11, 1997 pp. 355-384）。このN E Pクラスには、構造的に互いに関連している少なくとも7種類の酵素が含まれる（後を参照されたい）。それらは、典型的には、大きいカルボキシ末端細胞外ドメイン、短い膜に広がる領域、およびアミノ末端の短い細胞内ドメインと共になって、膜結合性である。このファミリーの既知のメンバーは、ネプリリシン（N E P、C D 10、C A L L A、エンケファリナーゼまたはE C 3. 4. 24. 11とも称される）、エンドセリン変換酵素（E C E - 1およびE C E - 2）、P E X、K E L L、X変換酵素／損傷誘発神経エンドペプチダーゼ（X C E / D I N E）、および齧歯類で同定された可溶性分泌エンドペプチダーゼ／ネプリリシンI Iと称される酵素（S E P / N E P I I ; G h a d d a r, G e t t a l, B i o c h e m J o u r n a l, V o l 347, 2000, pp. 419-429; I k e d a, K e t a l, J o u r n a l B i o l o g i c a l C h e m i s t r y, V o l 274, 1999, pp. 32469-32477; T a n j a, O e t a l, B i o c h e m B i o p h y s R e s e a r c h C o m m u n i c a t i o n, V o l 271, 2000, pp. 565-570; 国際特許出願WO 99/53077号）である。このクラスのメンバーの機能は、ペプチド作用性シグナリングに関連していると考えられる。これは、ヒトを含めた大部分の生物で見出される過程であり、ここにおいて、ペプチド分子は、生理学的応答を引き出す“メッセンジャー”として用いられる。典型的には、これは、時々、プロテアーゼによって切断されて活性になる不活性前駆体として、特定の細胞によるペプチドメッセンジャーの生産および放出を伴う。次に、このペプチドの活性型は、それが応答を引き出す別の細胞の表面上の特異的レセプターを結合する。次に、このペプチドは、別のプロテアーゼによる分解によって失活

30

40

50

する。

【0011】

NEPは、このクラスの発見される最初のメンバーであった。NEPは、多数の生物ペプチド、例えば、エンケファリン、ブラジキニンおよびサブスタンスP、をタンパク質分解し且つ失活させることができるという点で無差別なプロテアーゼである。それは、通常、疎水性残基のアミノ末端側のペプチドを切断する。NEPは、多数の体組織中で見出されうが、腎臓において最も量が多い。その生理学的機能は、十分に理解されていないが、NEP“ノックアウト”マウスの表現型からの一つの指標は、それが内毒素ショックの防止に関与しているということである。

【0012】

ECE-1は、NEPに37%一致するタンパク質である。ECE-1は、身体中に広く分布し、不活性な前駆体ペプチドであるビッグエンドセリンをエンドセリンに変換するが、これは、血管緊張を維持するのに重要な強力な血管収縮薬である。ECE-2酵素は、ECE-1とは別個の遺伝子に由来するが、そのアミノ酸配列は、59%の全体相同性で類似している。エンドセリン生産へのECE-2の生理学的重要性は不明である。ECE-2 mRNAは、ECE-1 mRNAよりはるかに低レベルで存在するが、ECE-1とは異なったpH最適条件を有し、中性pHで不活性であり、pH5.5で最も活性である。

10

【0013】

KELL酵素は、赤芽球組織で見出されるNEPクラスの臨床的に重要なメンバーである。KELL血液型系の抗原は、輸血への溶血反応を引き起こすことがありうるこのタンパク質に存在する。

20

【0014】

PEX遺伝子は、低下した腎尿細管リン酸塩再吸収を典型とする優勢な障害である、X連鎖低リン酸血症性くる病と称される障害に遺伝的に連鎖していると同定された。NEPファミリーの他のメンバーとのその近い相同性(49~60%)に基づき、それは、膜結合性メタロプロテアーゼであるとも予測されるが、基質はまだ発見されていない。

【0015】

XCE (Valdenaire, O et al, Molecular Brain Research, Vol 64, 1999, pp. 211-221) およびそのラット均等物DINE (Kiryu-Seo, S et al, Proceedings of the National Academy of Science USA, 2000, pp. 4345-4350) は、中枢神経系において主に発現される。DINE発現は、ニューロン損傷後にアップレギュレーションされるが、これは、おそらくは、抗酸化酵素のDINEに媒介されるタンパク質分解活性化の結果として、ニューロンアポトーシスを妨げるのを助けると考えられる。XCE/DINEの生理学的基質もまだ同定されていないが、それらの配列から、明らかに、それらはプロテアーゼであると考えられ、そしてDINEについては、合成ペプチド基質を用いてこれが証明されている。

30

【0016】

齧歯類SEPおよびNEPIIは、ごく最近発見された。それらは91%のアミノ酸同一性を有するので、NEPIIは、マウス酵素であるSEPのラット均等物であると考えられる。それらは、アミノ酸配列がNEPに最も近いこのクラスのメンバーであり、両方とも、ヒトNEPに54%一致する。両者のmRNAは、精巣において極めて量が多く、広範囲の他の組織においても低レベルで検出されることがありうる。ラットNEPIIの場合、そのmRNAは、脳および下垂体においても比較的高レベルで見出されている。哺乳動物細胞中で組換えによって生じる場合、マウスSEPおよびラットNEPIIは両方とも、増殖培地中に見出されうる。これは、それらが、循環することができ、したがって身体中の他の部位でペプチドを切断することができる分泌プロテアーゼでありうるということを示唆している。マウスSEPおよびラットNEPIIは、ECE-1のようなこのクラスのいくつかの他のメンバーと同様、スプライス変異を示す。マウスSEPおよびラッ

40

50

トNEPIIの場合、このスプライス変異は、膜の局在化および分泌に関する配列の変化を含むイソ型を生じる。これの生理学的有意性は不明であるが、これら酵素の膜結合型、循環型、および細胞内在型が存在しうると考えられる。マウスSEPは、エンケファリン、エンドセリン、ビッグエンドセリン、ブラジキニンおよびサブスタンスPを含めた一定範囲の重要な生物ペプチドを切断しうることが分かった。したがって、NEPと同様、それは、かなり広い基質特異性を有するので、別々の組織においていくつかの生理学的機能を有することがありうる。

【0017】

このNEPクラスの酵素は、他のメタロプロテアーゼ酵素と同様、薬物様低分子（例えば、チオルファン（thiorphan）およびホスホラミドン）による阻害に影響を受けやすいことが示されている。これは、ペプチド作用性シグナリングをモジュレートする場合のNEP様酵素のいくつかのメンバーの生理学的機能の現れている性状と一緒に、それらを薬学的介入のための魅力のある標的にする。NEP阻害剤は、心臓血管疾患を含めた適応症のために開発されているが、それらの機能の情報が更に増加するにつれ、NEP様酵素の特異的阻害剤は、性的機能不全（特に、男性性的機能不全、例えば、男性勃起機能不全（MED）、および女性性的機能不全（FSD）、例えば、女性性的興奮障害（FSAD））、早産、子癇前症、子宮内膜症、生殖障害（特に、男性および女性の不妊症、多嚢胞性卵巣症候群、着床不全）、高血圧症、心不全、アングナ、腎機能不全、周期性水腫、高アルドステロン症、緑内障、喘息、炎症、白血病、痛み、てんかん、情動障害、痴呆および老年性錯乱、肥満症および胃腸障害（特に、下痢および過敏性腸症候群）、敗血症性ショック、胃酸分泌のモジュレーション、および高レニン血症の処置などの多数の他の適応症の予防および／または処置にある役割を有することがありうると考えられる。

【0018】

性的機能不全

性的機能不全（SD）は、男性および女性双方に影響しうる重要な臨床的問題である。SDの原因は、器質的でありうるし、心理学的でもありうる。SDの器質的側面は、典型的には、高血圧症または真性糖尿病に関連した疾患のような潜在する血管疾患によって、処方薬によっておよび／またはうつ病のような精神医学的疾患によって引き起こされる。生理学的因子には、恐怖、行為不安および対人間葛藤が含まれる。SDは、性的行為を損ない、自尊心を傷つけ、そして人間関係を破壊することによって、人格窮迫を引き起こす。臨床において、SD障害は、女性性的機能不全（FSD）障害および男性性的機能不全（MSD）障害に分けられている（Melman et al 1999）。FSDは、女性が性的表現に満足を見出すことが難しいことまたはできないこととして最もよく定義される。男性性的機能不全（MSD）は、概して、男性勃起機能不全（MED）としても知られる勃起機能不全に関連している（Benet et al 1994）。

【0019】

本発明の化合物は、男性の場合の性的機能不全（例えば、男性勃起機能不全—MED）および女性の場合の女性性的機能不全（FSD）、例えば、女性性的興奮障害（FSAD）の予防および／または処置に特に有益である。

【0020】

女性性的機能不全（FSD）

本発明において、FSDは、女性が性的表現に満足を見出すのが難しいことまたはできないこととして定義することができる。FSDは、いくつかの異なった女性性的障害についての集合名である（Leiblum, S. R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. Int. J. Impotence Res., 10, S104-S106; Berman, J. R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluations and treatment options. Urology, 54, 385-391.）。それら女性は、

欲求の欠如、性的興奮またはオルガスムの困難、性交痛、またはこれら問題の組合せを有することがありうる。疾患のいくつかのタイプ、投薬、傷害または心理学的問題は、FSDを引き起こすことがありうる。開発中の処置は、FSDの特定のサブタイプ、優先的には、欲求および性的興奮の障害を処置することを的に行っている。

【0021】

FSDのカテゴリーは、正常な女性性的応答の様相、すなわち、欲求、性的興奮およびオルガスムにそれらを対比することによって最もよく定義される (Leiblum, S. R. (1998). *Definition and classification of female sexual disorders*, Int. J. Impotence Res., 10, S104-S106)。欲求または性欲は、性的表現の動因である。その徴候には、しばしば、関心のある相手と一緒にいる場合または他の性的刺激にさらされた場合の性的思考が含まれる。性的興奮は、性的刺激への血管応答であり、その重要な成分は、性器充血であり、そしてそれには、増加した腔潤滑、腔の伸長および増加した性器感覚／感受性が含まれる。オルガスムは、性的興奮中に絶頂に達した性的緊張の解放である。

【0022】

したがって、FSDは、女性がこれら様相のいずれか、通常は、欲求、性的興奮またはオルガスムに不十分なまたは不満足な応答をする場合に起こる。FSDカテゴリーには、活動低下状態の性的欲求障害、性的興奮障害、オルガスム障害および性的苦痛障害が含まれる。本発明の化合物は、(女性性的興奮障害の場合のように) 性的刺激への性器応答を改善するであろうが、その場合、それは、関連した苦痛、性交に関連した窮迫および不快も改善することができ、したがって、他の女性性的障害を処置することができる。

【0023】

したがって、本発明の好ましい側面により、活動低下状態の性的欲求障害、性的興奮障害、オルガスム障害および性的苦痛障害の処置または予防のための、より好ましくは、性的興奮障害、オルガスム障害および性的苦痛障害の処置または予防のための、そして最も好ましくは、性的興奮障害の処置または予防での薬剤の製造における本発明の化合物の使用を提供する。

【0024】

活動低下状態の性的欲求障害は、女性が性的である欲求を全くまたはほとんど持たないし、性的思考または空想を全くまたはほとんどしない場合に存在する。このタイプのFSDは、自然閉経かまたは外科的閉経のための低テストステロンレベルによって引き起こされることがありうる。他の原因には、疾病、投薬、疲労、うつ病および不安が含まれる。

【0025】

女性性的興奮障害(FSAD)は、性的刺激への不十分な性器応答を特徴とする。性器は、正常な性的興奮を特徴付ける充血をしない。腔壁は十分に潤滑されないため、性交は苦痛である。オルガスムは妨げられうる。性的興奮障害は、閉経時または出産後および授乳期の減少したエストロゲンによって、更には、糖尿病およびアテローム性動脈硬化症のような血管成分を伴う疾病によって引き起こされることがありうる。他の原因は、利尿薬、抗ヒスタミン薬、抗うつ薬、例えば、選択的セロトニン再吸収阻害剤(SSRI)または抗高血圧症薬での処置に起因する。

【0026】

性的苦痛障害(性交疼痛症および腔痙を含む)は、陰茎挿入に起因する痛みを特徴とし、潤滑を減少させる投薬、子宮内膜症、骨盤内炎症性疾患、炎症性腸疾患または尿路の問題によって引き起こされることがありうる。

【0027】

FSDの有病率は、その用語が、そのいくつかは測定し難い問題のいくつかのタイプにわたっているため、そしてFSDを処置することへの関心が比較的最近であるため、判定するのが難しい。多数の女性の性的問題は、直接的には、女性の加齢過程かまたは糖尿病および高血圧症のような慢性疾患に関連している。

【0028】

FSDは、性的応答周期の別々の様相で症状を発現するいくつかのサブタイプから成るもので、単一の療法は存在しない。FSDの現行の処置は、主に、心理学的または関連性の問題に集中している。FSDの処置は、より臨床的な且つ基礎的な科学研究がこの医学的問題の研究についてなされるにつれ、徐々に発展している。女性の性的病気は、病態生理学において、特に、女性の性的病気全体の原因となる血管形成機能不全の成分（例えば、FSAD）を有することがありうる個々人について、全て心理学的であるとは限らない。現在のところ、FSDの処置用に認可された薬物はない。経験的薬物療法には、エストロゲン投与（局所にまたはホルモン置換療法としての）、アンドロゲン、またはブスピロンまたはトラゾドンのような気分改変薬が含まれる。これら処置選択は、しばしば、低い効力または許容し得ない副作用のために、満足するものではない。 10

【0029】

FSDを処置することへの薬理学的関心は比較的最近であるので、療法は、次の、心理学的カウンセリング、一般市販用性的潤滑剤、および他の状態に承認された薬物を含めた治療候補物から成る。これら投薬は、テストステロンかまたは、エストロゲンおよびテストステロンの組合せのホルモン剤、およびより最近では、男性勃起機能不全（MED）に有効であると証明された血管薬から成る。これら試剤で、FSDを処置するのに有効であると示されたものはまだない。

【0030】

考察されるように、本発明の化合物は、女性性的興奮障害（FSAD）の予防および／または処置に特に有用である。 20

The Diagnostic and Statistical Manual (DSM) IV of the American Psychiatric Association では、女性性的興奮障害（FSAD）を：

“・・・性的興奮状態の性的活性十分な潤滑膨張応答の完了まで到達するまたは維持することが永続的にまたは再発的にできないこと。この障害は、顕著な窮迫または対人間困難を引き起こすに違いない。・・・”と定義している。

【0031】

この興奮応答は、骨盤内の血管うっ血、腔潤滑、および外性器の拡大および膨張から成る。この障害は、顕著な窮迫および／または対人間困難を引き起こす。カップルの性的機能不全を調査している研究は、女性の76%までが性的機能不全の病気を持っていること、および米国の女性の30～50%がFSDを経験していることを示している（Berman, J. R., Berman, L. A., Werbin, T. J. et al. (1999). Female sexual dysfunction: Anatomy, physiology, evaluation and treatment options. Curr. Opin. Urology, 9, 563-568）。 30

【0032】

FSADは、閉経前、閉経周辺期および閉経後（±ホルモン置換療法（HRT））の女性を襲う極めて一般的な性的障害である。それは、うつ病、心臓血管疾患、糖尿病および泌尿生殖器（UG）障害のような付随障害に関連している。 40

【0033】

FSADの一次結果は、充血／膨張の不足、潤滑の不足、および快い性器感覚の不足である。FSADの二次結果は、減少した性的欲求、性交中の苦痛およびオルガスムに達するのが難しいことである。

【0034】

最近になって、FSADの症状を有する患者の少なくとも一部分について、血管が根拠であると仮定され（Goldstein et al., Int. J. Impot. Res., 10, S84-S90, 1998）、動物データがこの見解を支持している（Park et al., Int. J. Impot. Res., 9, 27-37, 1997）。 50

【0035】

F S A Dを処置するための薬物候補は、効力について調査中であるが、主として、男性性器への循環を促す勃起機能不全療法である。それらは、二つのタイプの製剤、すなわち、経口または舌下用薬剤（アポモルフィン、フェントラミン、ホスホジエステラーゼ5型阻害剤、例えば、シルденаフィル（S i l d e n a f i l））、および注射または男性の場合は経尿道でおよび女性の場合は性器に局所投与されるプロスタグランジン（P G E₁）から成る。しかしながら、これら療法で、F S A Dの処置に有効であることが示されたものはまだない。

【0036】

理論によって拘束されたくはないが、本発明者は、血管作用性腸管ペプチド（V I P）のような神経ペプチドが、女性性的興奮応答の制御、特に、性器血流の制御における主要な神経伝達物質候補であると考えている。V I Pおよび他の神経ペプチドは、S E Pによって分解される／代謝される。したがって、S E P阻害剤は、興奮中に放出されるV I Pの内因性血管弛緩作用を増強するであろう。これは、増進した性器血流およびそれゆえの性器充血などによって、F S A Dの予防および／または処置をもたらすであろう。本発明者は、S E Pの阻害剤が、骨盤神経に刺激されるおよびV I Pに誘発される膣および陰核の血流の増加を促すということを示した。更に、本発明者は、S E P阻害剤が、分離された膣壁のV I Pおよび神経に媒介される弛緩を促すということを示した。

【0037】

したがって、本発明は、正常な性的興奮応答、すなわち、膣、陰核および陰唇の充血をもたらす増加した性器血流を回復させる手段を提供するのを助けるので好都合である。これは、血漿浸出による増加した膣潤滑、増加した膣コンプライアンス、および増加した性器感受性をもたらすであろう。

【0038】

したがって、本発明は、正常な性的興奮応答を回復させるまたは増強する手段を提供する。

本明細書中の女性性器は：“生殖器は、内部および外部の群から成る。内器官は、骨盤内に位置し、卵巣、卵管、子宮および膣から成る。外器官は、泌尿生殖器隔膜の表面および骨盤帯の下である。それらは、恥丘、大陰唇および小陰唇、陰核、前庭、前庭球、および大前庭腺を含む”（Gray's Anatomy, C. D. Clemente, 13th American Edition）を意味する。

【0039】

R. J. Levin は、“・・・男性および女性性器は、発生学的に共通の組織原基から発生しているので、男性および女性性器構造は、互いに相同であると論じられている。したがって、陰核は陰茎相同物であり、陰唇は陰囊の相同物である。・・・”（Levin, R. J. (1991), Exp. Clin. Endocrinol., 98, 61-69）ということを示している。

【0040】

男性勃起機能不全（MED）

いくらかの個人は、男性勃起機能不全（MED）に苦しむことがありうるということが知られている。

【0041】

男性勃起機能不全（MED）は：

“・・・満足 of いく性的行為のために陰茎勃起を達成するおよび／または維持することができないこと（NIH Consensus Development Panel on Impotence, 1993）・・・”と定義される。

【0042】

全段階（最低限の、中程度のおよび完全なインポテンス）の勃起機能不全（ED）の有病率は、40歳～70歳の男性の52%であり、70歳を越える男性ではより高い比率であると推定されている（Melman et al 1999）。その状態は、患者およびそ

のパートナーの生活の質に重大な悪影響を及ぼし、しばしば、うつ病および乏しい自尊心をもたらす増加した不安および緊張を引き起こす。20年前には、MEDは主に心理学的障害であると考えられていたが（Benet et al 1994）、現在は、患者の大部分について、根本的な器質的原因があるということが知られている。結果として、正常な陰茎勃起の機作およびMEDの病態生理学を明らかにすることについて多くの進展がなされた。

【0043】

陰茎勃起は、海綿体平滑筋の収縮および弛緩の平衡および陰茎の脈管構造に依存する血行力学的イベントである（Lerner et al 1993）。海綿体平滑筋は、本明細書中において、体平滑筋または複数の意味で海綿体とも称する。海綿体平滑筋の弛緩は、海綿体の小柱腔中への増加した血流をもたらし、それらが周囲の膜に対して拡大し且つ排出静脈を圧迫するようにさせる。これは、極めて大きい血圧上昇を生じ、これが勃起を引き起こす（Naylor, 1998）。

10

【0044】

勃起過程に起こる変化は複雑であり、末梢および中枢の神経系および内分泌系を包含する高度の協調された制御を必要とする（Naylor, 1998）。体平滑筋収縮は、シナプス後 α_1 アドレノセプターの活性化による交感神経ノルアドレナリン作用性神経支配によってモジュレートされる。MEDは、海綿体の内因性平滑筋緊張の増加に関連することがありうる。しかしながら、体平滑筋弛緩過程は、非アドレナリン作用性・非コリン作用性（NANC）神経伝達によって部分的に媒介される。陰茎中に見出される酸化窒素（NO）以外の他のNANC神経伝達物質は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）および血管作用性腸管ペプチド（VIP）など多数存在する。この弛緩を媒介する原因となる主な弛緩因子はNOであり、これは、一酸化窒素合成酵素（NOS）によってL-アルギニンから合成される（Taub et al 1993; Chuang et al 1998）。体平滑筋緊張を低下させることは、NOが海綿体の弛緩を引き起こすのを助けうると考えられている。男性の場合の性的興奮の際、NOはニューロンおよび内皮から放出され、平滑筋細胞および内皮中にある可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）に結合してそれを活性化させて、細胞内サイクリックグアノシン3',5'-リン酸（cGMP）レベルの上昇をもたらす。このcGMPの上昇は、プロテインキナーゼG活性化を包含すると考えられる未知の機作によって（おそらくは、 Ca^{2+} ポンプの活性化および Ca^{2+} に活性化される K^+ チャンネルによって; Chuang et al., 1998）、細胞内カルシウム濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）の減少による海綿体の弛緩をもたらす。

20

30

【0045】

クエン酸シルデナフィル（バイアグラ（ViagraTM）とも称される）は、最近、PfizerによってMEDのための最初の経口薬処置として開発された。シルデナフィルは、ホスホジエステラーゼ5（PDE5）を選択的に阻害することによって海綿体中のcGMP分解を阻害することによって作用し、それによって、cGMPの5'GMPへの加水分解を制限し（Boolel et al., 1996; Jeremy et al., 1997）、そしてそれによって、cGMPの細胞内濃度を増加させて海綿体平滑筋弛緩を容易にする。

40

【0046】

現在、プロスタグランジン基剤化合物、すなわち、尿道内に（Vivus Inc. から MuseTMとして入手可能）または小針注射によって（Pharmacia & Upjohn から CaverjectTMとして入手可能）投与することができるアルプロスタジル（alprostadil）での処置のような他の利用可能な市販MED療法は全て、不都合であるかおよび／または侵襲性である。他の処置には、真空狭窄装置、血管作用性薬注射または陰茎プロテーゼ植込み（Montague et al., 1996）が含まれる。注射可能な血管作用性薬は高い効力を示すが、陰茎痛、線維症および持続勃起症などの副作用が一般的であるし、注射療法は経口療法ほど好都合ではないので、現在のところ、シルデナフィルが最も好ましい市販療法である。

50

【0047】

陰茎または海綿体中のまたは勃起機作／過程におけるSEPの発現または機能的役割について、文書による証拠は従来存在しない。

陰茎または海綿体へのまたは代わりに勃起機作／過程におけるSEP阻害剤の機能的または生化学的作用についても、文書による証拠は従来存在しない。

【0048】

膣または陰核海綿体中のまたは女性性的興奮機作／過程におけるSEPの発現または機能的役割について、文書による証拠は従来存在しない。

膣または陰核海綿体中のまたは女性性的興奮機作／過程におけるSEP阻害剤の機能的または生化学的作用についても、文書による証拠は従来存在しない。

10

【0049】

したがって、本発明の将来性のある知見は、性的機能不全、特に、MEDまたはFSADに苦しむ男性または女性を、可溶性分泌エンドペプチダーゼ阻害剤(SEPi)の使用で処置する能力である。驚くべきことに、本出願人は、SEPiでのSEPの阻害が、神経に刺激される性的興奮過程を有意に増進するという見出し。

【0050】

本発明は、正常な性的興奮応答、すなわち、男性の場合は陰茎の勃起をもたらす増加した陰茎血流、および女性の場合は性器充血をもたらす増加した膣陰核血流を回復させる手段を提供するので、好都合である。したがって、本発明は、正常な性的興奮応答を回復させるまたは増強する手段を提供する。

20

【0051】

発明の概要

広範な側面において、本発明は、新規なアミノ酸配列に関する。これに関して、具体的新規アミノ酸配列が同定されており、本発明がその配列、ならびに、その新規な変異体、フラグメント、誘導体およびホモログを包含するということは理解されるはずである。

【0052】

もう一つの広範な側面において、本発明は、新規な核酸配列に関する。これに関して、具体的新規核酸配列が同定されており、本発明がその配列、ならびに、その新規な変異体、フラグメント、誘導体およびホモログを包含するということは理解されるはずである。

【0053】

したがって、要するに、本発明のいくつかの側面は、次に関する：

30

1. 新規なアミノ酸。
2. 新規なヌクレオチド配列。

【0054】

3. これら新規な配列を用いた検定。
4. これら検定の使用によって識別される化合物／組成物。
5. これら新規な配列を含むまたは発現する発現系。

【0055】

6. これら新規な配列に基づく予防および／または処置の方法。
7. これら新規な配列に基づく医薬組成物。

40

本発明のアミノ酸配列および／または本発明のヌクレオチド配列に関する他の側面には、本発明の配列を含むまたは発現することができる構築物；本発明の配列を含むまたは発現することができるベクター；本発明の配列を含むまたは発現することができるプラスミド；本発明の配列を含むまたは発現することができる組織；本発明の配列を含むまたは発現することができる器官；本発明の配列を含むまたは発現することができる形質転換された宿主；および本発明の配列を含むまたは発現することができる形質転換された生物、が含まれる。本発明は、更に、それらを転移する方法を含めた、微生物中での発現のような、それらを発現する方法を包含する。

【0056】

次の注釈において、“本発明のヌクレオチド配列”および“本発明のアミノ酸配列”の意

50

味は、それぞれ、本明細書中に示されたまたは論じられたヌクレオチド配列のいずれか一つまたはそれを越えるもの、および本明細書中に示されたまたは論じられたアミノ酸配列のいずれか一つまたはそれを越えるものを意味する。更に、本明細書中に用いられるように、“アミノ酸配列”とは、ペプチドまたはタンパク質の配列を意味し、それらの一部分を意味してよい。更に、“本発明のアミノ酸配列”という用語は、“本発明のポリペプチド配列”という句と同義語である。更に、“本発明のヌクレオチド配列”という用語は、“本発明のポリヌクレオチド配列”という句と同義語である。

【0057】

発明の詳細な側面

本発明の一つの側面においては、単離されたおよび／または精製されたポリヌクレオチド 10
であって、

- (a) 配列番号：2に示されるポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号：1または配列番号：5のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；
- (c) NCIMB41110中に含有されるDNAによって発現されたポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチド；
- (d) (a)～(c)のいずれか一つのポリヌクレオチドに少なくとも83%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；
- (e) (a)～(d)のいずれか一つのポリヌクレオチドにハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；
- (f) (a)～(e)のいずれか一つのポリヌクレオチドの相補鎖；または 20
- (g) (a)～(f)のいずれか一つのポリヌクレオチドのポリヌクレオチドフラグメント

の内の一つまたはそれを越えるものを含むポリヌクレオチドを提供する。

【0058】

配列番号：2のポリペプチドについて、それらアミノ酸のいずれか一つまたはそれを越えるものは、それらの類似体でありうる。

本明細書中で用いられる“類似体”という用語は、配列番号：2の配列に類似した配列を有する配列であるが、非有害（すなわち、酵素活性に有害でない）アミノ酸置換または欠失が起こっている配列を意味する。

【0059】

好ましくは、このポリヌクレオチドは、上の(a)～(c)のいずれか一つのポリヌクレオチドに少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、このポリヌクレオチドは、上の(a)～(c)のいずれか一つのポリヌクレオチドに少なくとも87%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。なお一層好ましくは、このポリヌクレオチドは、上の(a)～(c)のいずれか一つのポリヌクレオチドに少なくとも89%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。また更に好ましくは、このポリヌクレオチドは、上の(a)～(c)のいずれか一つのポリヌクレオチドに少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。最も好ましくは、このポリヌクレオチドは、上の(a)～(c)のいずれか一つのポリヌクレオチドに少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。 40

【0060】

好ましくは、上記のポリヌクレオチドは、アミノ酸配列MGKSEGPVGを含むポリペプチドをエンコードしている。好ましくは、このアミノ酸配列MGKSEGPVGは、そのポリペプチドのアミノ末端にまたはその付近にある。

【0061】

好ましくは、上記のポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCGTGGGGを含む。好ましくは、このヌクレオチド配列ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCGTGGGGは、そのポリヌクレオチドの5'末端にまたはその付近にある。

【0062】

上記のポリヌクレオチドは、好ましくは、可溶性分泌エンドペプチダーゼ（S E P）、好ましくは、ヒト S E P をエンコードしている。

本発明は、更に、上記のポリヌクレオチドの少なくとも 15 個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプローブもしくはプライマー、またはその相補鎖を提供する。好ましくは、このプローブまたはプライマーは、この S E P コーディング配列を他の配列から特異的に区別することができる。

【0063】

本発明は、また更に、上記のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

本発明のもう一つの側面により、上記のベクターで形質転換されたまたはトランスフェクションされた宿主細胞を提供する。好ましくは、この宿主細胞は、哺乳動物、細菌または酵母の細胞である。 10

【0064】

本発明によって更に提供されるのは、上記のポリヌクレオチドの転写された R N A 産物である。

本発明によって更に提供されるのは、上記のこの R N A 産物に関してアンチセンスであって、それにハイブリッド形成することができる R N A 分子またはそのフラグメントである。

【0065】

上記のポリヌクレオチドに結合することができるリボザイムまたはジンクフィンガータンパク質も、本発明によって提供する。 20

本発明のまた更にもう一つの側面により、ポリペプチドまたはそのフラグメントを製造する方法であって、宿主細胞を上記のベクターで形質転換しまたはトランスフェクションし、そしてその形質転換された／トランスフェクションされた宿主細胞を、培地中においてこのポリペプチドまたはフラグメントの発現に十分な条件下で培養することを含む方法を提供する。好ましくは、このポリペプチドまたはフラグメントを培地中に分泌させる。この方法は、好ましくは、ポリペプチドまたはフラグメントを培地から回収することを更に含む。

【0066】

本発明は、ポリペプチドまたはそのフラグメントを発現することができる細胞を生じる方法であって、上記のベクターで細胞を形質転換するまたはトランスフェクションすることを含む方法を更に提供する。 30

【0067】

本発明のもう一つの態様により、上記の方法によって生じた細胞を提供する。更に、上の方法によって生じる上記のポリペプチドまたはそのフラグメントを提供する。

【0068】

本発明のもう一つの側面により、S E P 活性を有するポリペプチドであって、

(a) 配列番号：1 または配列番号：5 のポリヌクレオチド配列から翻訳される推定のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびその変異型、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；

(b) 配列番号：2 のポリペプチドおよびその変異型、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体； 40

(c) N C I M B 4 1 1 1 0 の c D N A によってエンコードされたポリペプチドおよびその変異型、フラグメント、ホモログ、類似体および誘導体；または

(d) ポリペプチドであって、(i) 配列番号：1 または配列番号：5 のポリヌクレオチドによってエンコードされたポリペプチド、(ii) 配列番号：2 のポリペプチド、または (iii) N C I M B 4 1 1 1 0 の c D N A によってエンコードされたポリペプチド、と少なくとも 78 % の同一性を有するもの

の内の一つまたはそれを越えるものを含むポリペプチドを提供する。

【0069】

好ましくは、このポリペプチドは、(i) 配列番号：1 または配列番号：5 のポリヌクレ 50

オチドによってエンコードされたポリペプチド、(i i) 配列番号：2 のポリペプチド、または (i i i) NCIMB 41110 の cDNA によってエンコードされたポリペプチド、と少なくとも 85 %、好ましくは、少なくとも 90 %、より好ましくは、少なくとも 95 %、最も好ましくは、少なくとも 98 % の同一性を有する。

【0070】

好ましくは、上記のポリペプチドは、アミノ酸配列 MGKSEGPVG を含む。好ましくは、このアミノ酸配列 MGKSEGPVG は、そのポリペプチドのアミノ末端にまたはその付近にある。

【0071】

好ましくは、上記のポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列 ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCCCGTGGGG を含む。好ましくは、このヌクレオチド配列 ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCCCGTGGGG は、そのポリヌクレオチドの 5' 末端にまたはその付近にある。 10

【0072】

本発明は更に、上記のポリペプチドに対する抗体を提供する。

本発明は、また更に、上記のポリペプチドをモジュレートする化合物を提供する。好ましくは、この化合物は、そのポリペプチドを阻害するまたは選択的に阻害する。

【0073】

本発明が更に提供するの、医薬組成物であって、上記の抗体または化合物および 1 種類またはそれを越える薬学的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物である。 20

【0074】

本発明のもう一つの側面により、上記のポリペプチドに結合するおよび／またはそれをモジュレートする候補モジュレーターを識別する方法であって、このポリペプチドを候補モジュレーターと接触させ、そしてモジュレーションが起こるかどうか確かめることを含む方法を提供する。

【0075】

好ましくは、この方法は、

(a) (i) 上記のポリペプチドの基質ペプチドと (i i) 上記のポリペプチドとを、(i i i) 上記のポリペプチドの候補モジュレーターの存在下で接触させ、ここにおいて、この基質ペプチドは、上記のポリペプチドによるこの基質ペプチドの切断に応答して検出可能なシグナルを与えることができ；そして 30

(b) 上記のポリペプチドによるこの基質ペプチドの切断が、この候補モジュレーターによってモジュレートされたか否かを、この基質ペプチドに関連したこの検出可能なシグナルの存在または不存在を検出することによって確かめる；

ことを含む。

【0076】

好ましくは、この候補モジュレーターは候補阻害剤である。より好ましくは、この基質ペプチドを、少なくとも 1 種類の蛍光ドナー色素および少なくとも 1 種類の蛍光アクセプター色素で標識し、そして上記のポリペプチドの候補阻害剤を検出するのに用いられる検定は、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer) (FRET) 検定である。最も好ましくは、この標識された基質ペプチドは、ローダミングリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys (QSYTM-7)-βAla-NH₂ である。 40

【0077】

したがって、本発明の好ましい側面により、上記のポリペプチドに結合するおよび／またはそれを阻害する候補阻害剤を識別する方法であって、

(a) (i) 上記のポリペプチドの基質ペプチドと (i i) 上記のポリペプチドとを、(i i i) 上記のポリペプチドの候補阻害剤の存在下で接触させ、ここにおいて、この基質ペプチドは、上記のポリペプチドによるこの基質ペプチドの切断に応答して検出可能なシ 50

グナルを与えることができ；そして

(b) 上記のポリペプチドによるこの基質ペプチドの切断が、この候補阻害剤によって阻害されたか否かを、この基質ペプチドに関連したこの検出可能なシグナルの存在または不存在を検出することによって確かめる；

ことを含む方法を提供する。

【0078】

好ましくは、この基質ペプチドを、少なくとも1種類の蛍光ドナー色素および少なくとも1種類の蛍光アクセプター色素で標識し、そして上記のポリペプチドの候補阻害剤を検出するのに用いられる検定は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 検定である。最も好ましくは、この標識された基質ペプチドは、ローダミンググリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys (QSYTM-7)-βAla-NH₂ である。 10

【0079】

このSEP FRET検定は、NEPと一緒にの使用について、Carvalho et al. によって開発された検定に基づいている (Carvalho et al., Anna. Biochem. 237, pp. 167-173 (1996))。SEP FRET検定は、類似した分子内消光蛍光原性ペプチド基質 (similar intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrate) を利用するが、蛍光原性ドナー/アクセプター色素の新規な組合せ、具体的には、ローダミンググリーン (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) およびQSYTM-7 (以下、“QSY-7”または“QSY7”と記す；Molecular Probes, Inc.) を利用する。 20

【0080】

合成標識基質ペプチドローダミンググリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys (QSY7)-βAla-NH₂ の製造は、実施例部分 (以下) に詳述する。

【0081】

本発明の別の側面により、上記のポリペプチドに結合するおよび/またはそれをモジュレートする候補モジュレーターを識別する方法であって、このポリペプチドを候補モジュレーターと接触させ、そしてモジュレーションが起こるかどうか確かめることを含み、 30

(a) 上記のポリペプチドを分泌する細胞と候補モジュレーターを接触させ、このポリペプチドは、このポリペプチドへの候補モジュレーターの結合に関して検出可能なシグナルを与えることができる第二成分に結合していて；この接触は、このポリペプチドに候補モジュレーターを結合させるのに十分な条件下であり；そして

(b) ポリペプチドを結合することができる候補モジュレーターを、この第二成分によって生じるシグナルを検出することによって識別する；

ことを含む方法を提供する。

【0082】

更に、この方法は、

(a) (i) 上記のポリペプチドに結合することが知られている検出可能な第一成分および (ii) 候補モジュレーターを、上記ポリペプチドを分泌する細胞と接触させ、このポリペプチドは、このポリペプチドへの候補モジュレーターの結合に関して検出可能なシグナルを与えることができる第二成分に結合していて；この接触は、このポリペプチドに候補モジュレーターを結合させるのに十分な条件下であり；そして 40

(b) この第一成分がポリペプチドに結合するかどうかを、このポリペプチドと第一成分の相互作用により生じるシグナルの不存在またはそれ以外の場合を検出することによって確かめる；

ことを含む。

【0083】

上の方法のいずれかによって識別される候補モジュレーターは、好ましくは、上記のポリ 50

ペプチドに結合するおよび／またはそれを阻害する、すなわち、好ましくは、候補阻害剤である。

【0084】

さらなるの側面において、本発明は、女性性的機能不全、特に、F S A D、または男性性的機能不全、特に、M E Dを処置するのに用いることができる試剤（以下、S E P阻害剤またはS E P iと称する）を識別するための検定方法であって、ある試験薬が、内因性性器充血過程または勃起過程を直接的に増進することができるかどうか決定することを含み；ここにおいて、この増進は、本明細書中に定義の試験薬の存在下における性器血流または空洞内血圧（I C P）（および／または空洞血流）の増強として定義され；試験薬によるこのような増強は、この試験薬が、女性性的機能不全、特に、F S A D、または男性性的機能不全、特に、M E Dの予防および／または処置において有用でありうるということを示すものであり、そしてここにおいて、この試験薬がS E P iである検定方法に関する。

10

【0085】

例として、本発明は、女性性的機能不全、特に、F S A D、または男性性的機能不全、特に、M E Dを処置するための、内因性性器興奮または勃起過程を直接的に増進することができる試剤を識別するための検定方法であって、ペプチド（好ましくは、ローダミングリーナー-G l y-G l y-d P h e-L e u-A r g-A r g-V a l-C y s（Q S Y 7）-β A l a-N H₂のような蛍光標識ペプチド）の代謝分解を阻害することができる部分を有する試験薬を接触させ、このペプチドは、通常はS E Pによって代謝され；そして一定時間後に残っているペプチドの活性および／またはレベルを（例えば、蛍光定量分析によって）測定することを含み；ここにおいて、蛍光によって測定されるペプチドレベルの変化は、この試験薬の効力（I C₅₀）を示し、且つこの試験薬が、女性性的機能不全、特に、F S A D、または男性性的機能不全、特に、M E Dの予防および／または処置において有用でありうるということを示すものであり；そしてここにおいて、この試剤がS E P iである検定方法に関する。

20

【0086】

さらなるの側面において、本発明は、（a）本発明による検定を実施し；（b）内因性性器興奮過程または勃起過程を直接的に増進することができる1種類またはそれを越える試剤を識別し；そして（c）一定量のそれら識別された1種類またはそれを越える試剤を製造する工程を含み；そしてここにおいて、この試剤がS E P iである方法に関する。

30

【0087】

この側面について、工程（b）で識別された試剤は、例えば、活性を最大限にするように修飾されてよく、その後、工程（a）を繰り返してよい。これら工程は、所望の活性または薬物動態学的プロファイルが得られるまで繰り返してよい。

【0088】

したがって、さらなる側面において、本発明は、（a 1）本発明の検定を実施し；（b 1）内因性性器興奮過程または勃起過程を直接的に増進することができる1種類またはそれを越える試剤を識別し；（b 2）この識別された1種類またはそれを越える試剤を修飾し；（a 2）場合により、工程（a 1）を繰り返す；そして（c）一定量のそれら識別された1種類またはそれを越える試剤（すなわち、修飾されたもの）を製造する工程を含み；そしてここにおいて、この試剤がS E P iである方法に関する。

40

【0089】

上記のいずれかの検定（またはその変法）を用いて識別されるいずれかの候補モジュレーター、候補阻害剤、候補選択的阻害剤、試剤（以下、S E P阻害剤またはS E P iと称する）等も、本発明の側面と考えられるということは理解されるはずである。

【0090】

したがって、本発明は、上記の方法（検定）のいずれか一つによって識別される候補モジュレーター、候補阻害剤、候補選択的阻害剤または試剤を提供する。

エンドペプチダーゼは、特に、生物活性ペプチド活性を調節すること（例えば、ペプチド

50

作用性シグナリング過程）に關与しているので、エンドペプチダーゼのモジュレーター（例えば、選択的阻害剤を含めた阻害剤）は、このような活性をモジュレートする場合に用いることができる。

【0091】

E C E - 1 のようないくつかのエンドペプチダーゼは、生物学的に不活性なペプチドのそれらの活性型へのタンパク質分解に關与している。したがって、エンドペプチダーゼのモジュレーター（例えば、選択的阻害剤を含めた阻害剤）は、このような活性をモジュレートする場合に用いることができる。

【0092】

ヒト S E P は、したがって、生物活性ペプチド活性を調節することおよび／または生物学的に不活性なペプチドのそれらの活性型へのタンパク質分解に關与することがありうる。 10

【0093】

したがって、本発明は、医薬として用いるための、上記のポリペプチドをモジュレートする抗体、化合物または組成物を提供する。このポリペプチドの阻害剤または選択的阻害剤として作用することができるこのような抗体、化合物または組成物は、したがって、ペプチド作用性シグナリング過程をモジュレートすることのような生物活性ペプチド活性を調節する側面に關する治療的分野においておよび／または生物学的に不活性なペプチドのそれらの活性型へのタンパク質分解において用いることができる。このような治療的に有用な分野には、性的機能不全（例えば、女性性的機能不全、特に、F S A D、または男性性的機能不全、特に、M E D）、妊孕性障害、アルツハイマー病および発作のような神経変性障害、高血圧症のような心臓血管疾患、創傷治癒／組織修復等が含まれるが、これらに制限されるわけではない。 20

【0094】

したがって、医薬として用いるための上記の抗体、化合物または組成物も提供する。更に、上記のポリペプチドをモジュレートする必要がある患者の予防および／または処置での薬剤の製造における上の化合物の使用を提供する。

【0095】

更に、上記のポリペプチドを阻害するまたは選択的に阻害する必要がある患者の予防および／または処置での薬剤の製造における上の化合物の使用を提供する。好ましくは、上の化合物のこの使用は、性的機能不全の予防および／または処置用の薬剤の製造の場合である。より好ましくは、この性的機能不全は、男性勃起機能不全（M E D）または女性性的機能不全（F S D）である。最も好ましくは、この女性性的機能不全（F S D）は女性性的興奮障害（F S A D）である。 30

【0096】

本発明のまた更にもう一つの側面により、上記のポリペプチドをモジュレートする必要がある患者の予防および／または処置の方法であって、この患者に治療的有效量の上記の化合物を投与することを含む方法を提供する。

【0097】

更に、上記のポリペプチドを阻害するまたは選択的に阻害する必要がある患者の予防および／または処置の方法であって、この患者に治療的有效量の上記の化合物を投与することを含む方法を提供する。 40

【0098】

また更に、患者の性的機能不全の予防および／または処置の方法であって、この患者に治療的有效量の上記の化合物を投与することを含む方法を提供する。好ましくは、この性的機能不全は、男性勃起機能不全（M E D）または女性性的機能不全（F S D）である。より好ましくは、この女性性的機能不全（F S D）は女性性的興奮障害（F S A D）である。

【0099】

好ましくは、この化合物はポリペプチドであり、この化合物の治療的有效量は、この化合物をエンコードしている且つこの化合物を *i n v i v o* で発現する D N A を患者に与 50

えることによって投与される。より好ましくは、この化合物はポリペプチド阻害剤であり、モジュレーションは、上記のポリペプチドの阻害または選択的阻害である。

【0100】

本発明によって更に提供されるのは、上記のポリペプチドをモジュレートする必要がある患者の予防および／または処置用の薬剤の製造における上記の抗体の使用である。好ましくは、このモジュレーションは、上記のポリペプチドの阻害または選択的阻害である。好ましくは、この予防および／または処置は、性的機能不全についてである。より好ましくは、この性的機能不全は、男性勃起機能不全（MED）または女性性的機能不全（FSD）である。最も好ましくは、この女性性的機能不全（FSD）は女性性的興奮障害（FSAD）である。

10

【0101】

本発明によって更に、上記のポリペプチドをモジュレートする必要がある患者の予防および／または処置の方法であって、この患者に治療的有効量の上記の抗体を投与することを含む方法を提供する。好ましくは、このモジュレーションは、上記のポリペプチドの阻害または選択的阻害である。好ましくは、この予防および／または処置は、性的機能不全についてである。より好ましくは、この性的機能不全は、男性勃起機能不全（MED）または女性性的機能不全（FSD）である。最も好ましくは、この女性性的機能不全（FSD）は女性性的興奮障害（FSAD）である。

【0102】

本発明の好ましい側面は、女性性的機能不全、特に、FSAD、または男性性的機能不全、特に、MEDの予防および／または処置において用いるための（または用いられている場合の）SEPi化合物およびSEPi化合物を含有する医薬組成物に関する。この医薬組成物中において、SEPiは、薬学的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤と所望により混合されている。ここで、この組成物は（本明細書中に述べられるいずれかの他の組成物のように）、男性性的機能不全、特に、MED、または女性性的機能不全、特に、FSADの予防および／または処置で引き続き用いるために包装されていてよい。

20

【0103】

もう一つの側面において、本発明は、女性性的機能不全、特に、FSAD、または男性性的機能不全、特に、MEDの予防および／または処置用の薬剤（医薬組成物のような）の製造における試剤の使用に関する。

30

【0104】

もう一つの側面において、本発明は、女性性的機能不全、特に、FSADを患っている女性、または男性性的機能不全、特に、MEDを患っている男性を処置する方法であって、陰核および膣での内因性性器興奮／充血応答または海綿体での勃起過程を増進することができるSEPiをその女性または男性に供給することを含み；ここにおいて、このSEPiは、本明細書中の前に定義の内因性興奮／勃起過程を増進する量で存在し；このSEPiは、薬学的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤と所望により混合され；そしてこのSEPiは本明細書中に定義の通りである方法に関する。

【0105】

もう一つの側面において、本発明は、女性性的機能不全、特に、FSAD、または男性性的機能不全、特に、MEDを処置する方法であって、膣／陰核血流、ICPまたは空洞血流を測定することによって *in vivo* において（例えば、ウサギにおいて）神経刺激される内因性性器興奮過程または勃起過程をある試剤で増強することにより；ここにおいて、この試剤は、*in vitro* 検定法において蛍光ペプチド（本明細書中で先述された、および以下に詳述される）の代謝分解を直接的に阻害することができ；この *in vitro* 検定法は、本発明による検定法であり；そしてこの試剤はSEPiである方法に関する。

40

【0106】

もう一つの側面において、本発明は、女性性的機能不全、特に、FSAD、または男性性的機能不全、特に、MEDの予防および／または処置用の医薬組成物の製造における試剤

50

の使用であって、ここにおいて、この試剤は、本発明の検定法によって *in vitro* で検定された場合に蛍光ペプチドの代謝分解を直接的に阻害することができ；そしてこの試剤は S E P i である使用に関する。

【0107】

好ましくは、本発明による男性および女性の性的機能不全、特に、M E D および F S A D の予防および／または処置で用いるための S E P 阻害剤 (S E P i) は、100 nM 未満、より好ましくは、50 nM 未満の IC_{50} を有する。

【0108】

好ましくは、本発明による S E P 阻害剤は、中性エンドペプチダーゼ N E P E C 3. 4. 24. 11 およびアンギオテンシン変換酵素 (A C E) に対するより 30 倍を越える、より好ましくは、50 倍を越える S E P 選択性を有する。これは、S E P i を全身に（例えば、口より）投与した場合の心臓血管イベント（例えば、血圧の降下）の見込みを減少させる。好ましくは、S E P i は、更に、エンドセリン変換酵素 (E C E) に対するより 100 倍を越える選択性を有する。 10

【0109】

S E P i 化合物は、実験の項（以下）に示される教示にしたがって製造される。それらを試剤として調べ、そしてそれらが内因性勃起過程を増進するのに有用であり、それによって M E D および F S A D の予防および／または処置において有用であることが判明した。

【0110】

いずれの特定の理論にも制限されることなく、本明細書中において、S E P を阻害することにより、性的興奮中に放出される、ニューロンによって放出される他の血管作用薬（おそらくは、血管作用性腸管タンパク質 (V I P)）が増進するということが考えられる。S E P i の使用は、性的刺激中に放出される神経ペプチド（おそらくは、V I P）の作用を増強し、それゆえ、空洞血流を増加させることによる男性勃起機作を増強し、したがって、性器血流を増加させることによる空洞内血圧および女性の充血を増強すると考えられる。 20

【0111】

更に、本発明の化合物の使用は、非 N O 依存性 N A N C 経路を増進することによって作用して、M E D および F S A D を処置する、および陰茎および膣／陰核中の硝酸作用性 (n i t r e r g i c) シグナリングを増強するまたは容易にすると考えられる。 30

【0112】

したがって、本発明の好ましい側面により、男性性的機能不全、特に、M E D、または女性性的機能不全、特に、F S A D の予防および／または処置用の薬剤の製造における、全身投与による（好ましくは、口による、例えば、嚥下可能錠剤またはカプセル剤、または舌下または口腔用製剤）S E P i の使用を提供する。

【0113】

本研究において、本発明者は、男性および女性の性的興奮の生理学についての強壮な再現可能モデルを開発した。このモデルは、麻酔されたウサギを用い、レーザー・ドップラー (L a s e r D o p p l e r) 技法を用いて空洞内血圧および性器血流を監視し、同時に、心臓血管パラメーターを常套的に記録する。本発明者は、試験薬の不存在下および存在下における骨盤神経刺激または V I P の注入によって引き起こされる陰茎中の空洞内血圧および膣（および陰核さえも）血流の僅かな変化を測定することができる。 40

【0114】

本発明者は、この動物モデルが、臨床データに直接的に反映すると考えている。したがって、このモデルを用いて、空洞内血圧の増加による陰茎勃起の増進および膣または陰核血流増進を測定するなどの、例えば、M E D および F S A D の予防および／または処置のための候補薬を研究することができる。

【0115】

したがって、さらなる側面により、本発明は、女性性的機能不全、特に、F S A D、または男性性的機能不全、特に、M E D を処置することができる試剤を識別するのに用いられ 50

る動物モデルであって、麻酔された雌または雄の動物の骨盤神経の刺激後のその腔／陰核血流、空洞内血圧および／または空洞血流の変化を測定する手段を含めたその動物を含み；そしてここにおいて、その試剤は S E P i である動物モデルに関する。

【0116】

さらなる側面において、本発明は、F S A D または M E D を処置するために内因性性器興奮過程または勃起過程を直接的に増進することができる試剤を識別する検定方法であって、本発明の動物モデルにある試剤を投与し；そして内因性性器興奮過程または勃起過程の変化を測定することを含み；ここにおいて、この変化は、定義の試験薬の存在下における動物モデルの腔／陰核血流、空洞内血圧（I C P）（および／または空洞血流）の増強として定義され；そしてその試剤は S E P i である検定方法に関する。

10

【0117】

さらなる側面において、本発明は、診断方法であって、女性または男性からの試料を単離し；その試料が、女性性的機能不全、好ましくは、F S A D、または男性性的機能不全、好ましくは、M E D を引き起こすような量で存在する物質を含有するかどうか決定することを含み；ここにおいて、その物質は、女性の内因性性器興奮過程または男性の海綿体の勃起過程への直接的作用を有し；しかもその物質は、ある試剤の使用によって有益な作用を得るようにモジュレートされることができ；そしてその試剤は S E P i である診断方法に関する。

【0118】

さらなる側面において、本発明は、単離された女性または男性の試料中の物質を検出する手段を含む診断用組成物またはキットであって；ここにおいて、その手段は、その試料が、女性性的機能不全、好ましくは、F S A D、または男性性的機能不全、好ましくは、M E D を引き起こす物質およびそのような量を含有するか、または性的機能不全、好ましくは、F S A D または M E D を引き起こすような量であるかどうか決定するのに用いることができ；その物質は、内因性性器興奮過程または勃起過程への直接的作用を有し、しかもその物質は、ある試剤の使用によって有益な作用を得るようにモジュレートされることができ；そしてその試剤は S E P i である診断用組成物またはキットに関する。

20

【0119】

本発明のいっそうさらなる側面により、本発明のポリペプチドを過剰発現する、過少発現するまたはその標的挿入または欠失を示すように *ex vivo* または *in vivo* で遺伝子操作された細胞を提供する。好ましくは、これら *in vivo* で遺伝子操作された細胞は、非ヒト動物中に含まれる。

30

【0120】

本発明は、更に、上記のポリペプチドを生じることができる受託番号 N C I M B 4 1 1 1 0 として寄託された細胞およびそれに由来しうる変異体および突然変異体を提供する。

【0121】

本発明によって更に提供されるのは、上記のポリペプチドの三次元構造を解明する方法であって、（a）ポリペプチドを精製し；（b）それを結晶化し；そして（c）その構造を、特に、X線結晶学によって解明する工程を含む方法である。

【0122】

さらなる側面において、本発明は、更に、上記のポリペプチドの構造をモデリングする方法であって、（a）既知の三次元構造を有するタンパク質、特に、ロドプシンの配列と一緒にその配列をアラインメントさせ；（b）上記のポリペプチドの検出された配列差を既知の構造上にマッピングし、（c）上記のポリペプチドの相同モデルを得る工程を含む方法に関する。

40

【0123】

参照しやすくするために、ここで、本発明のこれらおよび更に別の側面を適当な項目タイトルで論じる。しかしながら、各項目の下での教示は、具体的な項目各々に必ずしも制限されない。

【0124】

50

ヒト S E P 酵素

上に説明したように、本発明は、ヒト可溶性分泌エンドペプチダーゼ（ヒト S E P）と称された新規なエンドペプチダーゼ酵素、およびそれをエンコードしているヌクレオチド配列に関する。本発明は、更に、疾患の診断および予防および／または処置におけるそれら新規な核酸配列およびアミノ酸配列の使用に関する。本発明は、更に、エンドペプチダーゼ活性をモジュレートする（好ましくは、阻害するまたは選択的に阻害する）ことができる試剤を評価するおよび／またはスクリーニングするための、それら新規な核酸配列およびアミノ酸配列の使用に関する。本発明は、更に、エンドペプチダーゼ活性をモジュレートする（好ましくは、阻害するまたは選択的に阻害する）ことができる試剤を評価するおよび／またはスクリーニングするための、それら新規な核酸配列およびアミノ酸配列を含むまたは発現する遺伝子操作された宿主細胞に関する。 10

【0125】

ヒト S E P は、いろいろな源に存在し、およびそれらから入手可能であると考えられる。例として、ヒト S E P は、心臓血管系、神経系、内分泌系および精巣のいずれか一つまたはそれを越えるものに見出される。

【0126】

本発明者は、更に、S E P が多数の他の源、例えば、齧歯類動物（ネズミ（Ikeda et al., Journal Biological Chemistry, Vol 274, 1999, pp. 32469-32477）およびラット（NEP II-国際特許出願 WO 99/53077 号））、ウシ、ヒツジ、ブタおよびウマなどにも存在すると 20

【0127】

ヒト S E P は、天然に存在する形と同じであってよいが、この側面について、好ましくは、ヒト S E P は、非天然アミノ酸配列である（すなわち、それは、その自然環境中に存在しない）、またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体である。更に、または代わりに、ヒト S E P は、単離されたヒト S E P および／または精製されたヒト S E P である。ヒト S E P は、天然であろうとなかろうと、いずれか適当な源から入手可能でありうるしまたはそれによって生じうるし、またはそれは、合成、半合成またはリコンビナントであってよい。

【0128】

ヒト S E P コーディング配列は、天然に存在する形と同じであってよいが、この側面について、好ましくは、ヒト S E P コーディング配列は、非天然ヌクレオチド配列である（すなわち、それは、その自然環境中に存在しない）、またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体である。更に、または代わりに、ヒト S E P コーディング配列は、単離されたヒト S E P コーディング配列および／または精製されたヒト S E P コーディング配列である。ヒト S E P コーディング配列は、天然であろうとなかろうと、いずれか適当な源から入手可能でありうるしまたはそれによって生じうるし、またはそれは、合成、半合成またはリコンビナントであってよい。 30

【0129】

ヒト S E P 活性およびスクリーニング 40
ヒト S E P および／またはそのコーディング配列および／またはそれにハイブリッド形成することができる配列は、異なった S E P 間の薬物候補の選択性を調べるのに有用である。

【0130】

ヒト S E P は、種々の生物活性ペプチドを加水分解する（タンパク質分解する）ことができると考えられる。
ヒト S E P mRNA は、他の組織と比較して精巣中で最も量が多いということが（本明細書中で）示されている。これは、マウス S E P について公表されたデータ（Ghaddar et al., Biochemical Journal, Vol 347, 2000, pp. 419-429）と一致し、この場合の mRNA は、更に、円形および細長い精 50

子細胞に局在している。

【0131】

多様な異なるタンパク質分解活性が、以前に精巣中で識別されたが、ある場合には、それらは、精巣機能に本質的であることが分かっている（例えば、ACE活性）。この組織中におけるその豊富さから、SEPの一つの可能な生理学的役割は、精巣の機能に関連していると考えられる（例えば、妊孕性）。

【0132】

ヒトSEPは、精巣の妊孕性または別の機能の側面に関与している精巣中の特定の生理学的に重要な生物ペプチドを加水分解して、そのペプチドを活性化するかまたは失活させることができる。この（予想される）生理学的ペプチドの正確な性状は、まだ確認されていない。しかしながら、SEPは、ビッグエンドセリン、エンドセリン-1、アンジオテンシン-1、サブスタンスP、ブラジキニン、エンケファリンおよび心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）を含めた多数の生物ペプチドを加水分解することができる。これらのいくつかは、精巣中で機能することが知られている。エンドセリン-1は、例えば、精巣中で見出されるが、そこにおいてそれは、精細管収縮性を促すのに関与している。興味深いことに、エンドセリン-1をビッグエンドセリンから生じると考えられる精巣内で検出されるその酵素活性（ECE）は、阻害剤ホスホラミドンおよびチオルファンに感受性である。マウスSEPおよびおそらくはヒトSEPも、これら阻害剤に感受性であるので、この活性は、ECEよりもむしろSEPに関連しているかもしれない。ヒトSEP活性を阻害する化合物は、したがって、精巣内エンドセリンレベルを変化（増加または減少）させることがあり、これは、不妊症の予防および／または処置にまたは男性用避妊薬として潜在的に有用でありうる。

10

20

【0133】

血管作用性腸管ペプチド（VIP）は、精巣中で役割を果たすもう一つの潜在的ヒトSEP基質である。VIPは、精巣中の血流を増加させ、そして更に、精巣ステロイド合成並びにヒト精子運動性を促すことが分かっている（Siow et al, Archives of Andrology, Vol 43, 1999, p. 6771）。ヒトSEP活性を阻害する薬物は、精巣中のVIPレベルを、したがって、精巣血流、ステロイド合成または精子運動性をモジュレートするのに有用でありうる。

【0134】

ヒトSEP mRNAは、精巣中で最も量が多いが、それは、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）の敏感な方法を用いて、種々の組織中でのより低いレベルを検出することもできる。マウスの場合、SEPは、心臓、脳、脾臓、肺、腎臓、腸および副腎で検出されている。本明細書中において完全長ヒトSEP cDNA配列を単離するのに用いられたcDNAライブラリースクリーニングアプローチも、ヒトの脳、胎盤、小腸および腎組織に由来するライブラリー中でヒトSEP cDNAを識別した。

30

【0135】

ヒトSEP酵素は、細胞から分泌されることもありうる。したがって、ヒトSEPタンパク質は、精巣中で量が多いことに加えて、身体中の広範囲の他の組織中でも中程度のレベルで見出されるであろうと考えられる。これら組織中において、ヒトSEPは、上述の生物ペプチド基質を加水分解するであろうと考えられる。

40

【0136】

したがって、SEPの酵素活性を阻害する薬物は、種々の異なった組織中での上述の多数のヒトSEP基質のレベルを変化させるであろうと考えられる。これらヒトSEP基質は、通常は、ペプチド作用性シグナリング過程にしばしば関連している生物学的に活性な分子またはそれらの前駆体であるので、ヒトSEP阻害剤は、性的機能不全（例えば、女性性的機能不全、特に、FSAD、または男性性的機能不全、特に、MED）および生殖障害、並びに、神経変性障害（例えば、アルツハイマー病および発作）および高血圧症などの心臓血管疾患等のような他の疾患／障害がおそらく含まれるがこれに制限されるわけではない、ペプチド作用性シグナリングに関連した多数の異なった障害の予防および／また

50

は処置に有用でありうると考えられる。

【0137】

したがって、ヒトSE Pおよび／またはそのコーディング配列および／またはそれにハイブリッド形成することができる配列は、ペプチド作用性シグナリングに関連した疾患の予防および／または処置用の薬物候補をスクリーニングするのに有用でありうる。更に、ヒトSE Pおよび／またはそのコーディング配列および／またはそれにハイブリッド形成することができる配列は、上記の記載のような疾患の予防および／または処置用の薬物候補をスクリーニングするのに有用でありうると考えられる。

【0138】

ヒトSE Pをコードしているヌクレオチド配列またはヒトSE P酵素自体のどちらかまたは両方を用いて、SE P活性に影響を与えることができる試剤についてスクリーニングすることができる。具体的には、ヒトSE Pをコードしているヌクレオチド配列自体を用いて、SE P活性を阻害することができる試剤についてスクリーニングすることができる。更に、ヒトSE Pをコードしているヌクレオチド配列またはヒトSE P酵素自体を用いて、SE P活性を選択的に阻害するようにSE P活性を選択的に影響を与える試剤についてスクリーニングすることができる。

10

【0139】

ヒトSE P活性の測定－ヒトSE P検定

ヒトSE Pタンパク質の酵素（タンパク質分解）活性は、例えば、ヒトSE P酵素の試料と基質ペプチドとを緩衝液（例えば、50 mM HEPES；pH 7.4）中で混合し、その混合物を、SE P活性に適当な温度（典型的には、30～37℃）で、ヒトSE Pが作用してペプチド基質の測定可能な部分を生成物に切断するのに十分な一定時間（1～3時間など）インキュベートすることを含む検定で測定することができる。その後、タンパク質分解の基質および／または生成物を分析して、その基質がSE P酵素によって切断されたことを示すことができる。

20

【0140】

ヒトSE Pの活性を変化させることができるホスホラミドンおよびチオルファンのような、候補ヒトSE P阻害剤化合物または対照試験化合物の作用は、それらを初期混合物中に、典型的には、0.1 nM～50 μMの適当な試験濃度の範囲で含めることによってこのタイプの検定で測定することができる。

30

【0141】

上のタイプの検定で用いるのに適したSE P酵素の試料は、組換え発現系を用いて生じることができる。これは、典型的には、ヒトSE P cDNAまたは遺伝子（例えば、NCIMB 41110より入手可能な発現ベクター）を含有する発現プラスミドを宿主生物または細胞中に導入後、そこでヒトSE Pタンパク質を発現させることを含むであろう。SE Pタンパク質は、（例えば、哺乳動物細胞中で人為的に発現させる場合）その宿主から増殖培地中に放出される（すなわち、細胞外に分泌される）ことがありうるし、または細胞中に保持されることがありうる（例えば、酵母または昆虫細胞中で人為的に発現させる場合、そこでは、可能性のある不適切な発現は、ヒトSE Pを細胞から分泌させないことがあり、したがって、その細胞内部位からの単離を必要とすることがありうる）。典型的には、その宿主は、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞または細菌でありうる。次に、SE P酵素を、タンパク質精製法を用いる必要がありうる培地または宿主細胞から（例えば、細胞を溶解することによって）回収することができる。

40

【0142】

前述の検定のためのヒトSE P酵素は、（十分な量が入手可能である場合）適当な組織源から精製されてもよい。この組織には、精巣または脳が含まれうる。ヒトSE P検定で用いるのに適した基質は、有用な一定時間内に、例えば、5時間以内に測定可能な速度でSE Pが切断することができるいずれのペプチドでもありうる。このような基質ペプチドには、エンケファリン、VIP、ブラジキニン、サブスタンスP、ビッグエンドセリン、エンドセリン、アンギオテンシン－IまたはANPのような生物ペプチドと同様であるま

50

たは類似したペプチドが含まれるが、これらに制限されるわけではない。このペプチドは、検定前、中または後の基質および／または生成物の測定を容易にするであろう蛍光基、着色基、放射性基または他の化学基を含むように修飾される。

【0143】

ヒトSE P検定で用いるのに適した好ましい基質は、少なくとも1種類の蛍光ドナー色素および少なくとも1種類の蛍光アクセプター色素で標識されたSE P切断可能合成ペプチドであり、このSE P切断（タンパク質分解）の阻害を検出するのに用いられる検定は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）検定である。最も好ましくは、この標識された基質ペプチドは、低分子量蛍光原性ペプチド、好ましくは、ローダミンググリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys（QSY7）-βAla-NH₂である。

10

【0144】

このようなFRETに基づくSE P検定は、NE Pと一緒にの使用について、Carvalho et al. によって開発された検定に基づいている（Carvalho et al., Annal. Biochem. 237, pp. 167-173 (1996)）。SE P FRET検定は、類似の分子内消光蛍光原性ペプチド基質を利用するが、蛍光原性ドナー／アクセプター色素の新規な組合せ、具体的には、ローダミンググリーン（Molecular Probes, Inc.）およびQSY7（Molecular Probes, Inc.）を利用する。

20

【0145】

合成標識基質ペプチドローダミンググリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys（QSY7）-βAla-NH₂の製造を、実施例の項（以下）に詳述する。

【0146】

ヒトSE P検定で用いるのに適した緩衝液は、その中でヒトSE Pが活性であることが判明していて、それ以外には、検定の最終結果の妨げにならないもののいずれかでありうる。通常は、これは、中性pHを維持する緩衝液であろう。このような緩衝液の一例は、50mMトリスCl；pH7.4である。しかしながら、このような緩衝液は、トリスが、温度変動のためにpHを極めて変化させやすいので、ヒトSE P FRET検定で用いるのに好ましくない。したがって、ヒトSE P FRET検定で用いるのに好ましい緩衝液は、50mM HEPES；pH7.4である。

30

【0147】

ヒトSE P検定での基質および／または生成物の測定方法は、選択されるペプチド基質およびその修飾の性状に依存するであろう。例えば、選択される基質が蛍光基を含有する場合、蛍光計を用いることができる。同様に、基質が放射性標識されている場合、シンチレーション計数計を用いてよい。大部分の基質および生成物は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）または質量分析法を用いて測定することができ、これらは、その基質が放射性標識または蛍光標識を含むように修飾されなかった場合に選択される方法であると考えられる。

40

【0148】

更に、ヒトSE Pをコードしているヌクレオチド配列またはそれに相補的である配列も、検定において、ヒト細胞中のヒトSE Pコーディング配列の存在を検出するのに用いることができる。これら検定は、この酵素の組織分布および特定の疾患状態に関するその生物学的妥当性についての情報を提供すると考えられる。

【0149】

本発明は、ヒトSE P（その誘導体、フラグメント、ホモログまたは変異体を含めた）に対する抗体も包含する。ヒトSE Pに対する抗体は、検定において、ヒト細胞中のヒトSE Pの存在を検出するのに用いることができる。これら検定は、この酵素の組織分布および特定の疾患状態に関するその生物学的妥当性についての情報を提供すると考えられる。

【0150】

50

本発明は、更に、ヒト S E P 配列のスプライス変異体（イソ酵素）を包含する。具体的には、ヒト S E P イソ酵素、それをコードしているヌクレオチド配列、それに相補的であるヌクレオチド配列、およびそれに向けられた抗体のいずれか一つまたはそれを越えるものを検定で用いて、それらイソ酵素の一つに選択的に影響を与える試剤についてスクリーニングすることができる。これら検定は、これらイソ酵素各々の組織分布についての情報を提供し且つ特定の疾患状態に関するこれらイソ酵素各々の生物学的妥当性についての情報を提供すると考えられる。これら検定は、更に、当業者が、特定の組織または特定の疾患状態などにおいて、ヒト S E P の発現または活性に影響を与えるのに有用な試剤について調べ且つそれを識別することを可能にすると考えられる。

【0151】

10

本発明のポリペプチド

“タンパク質”という用語と同じ意味である“ポリペプチド”という用語には、一本鎖ポリペプチド分子、並びに個々の構成ポリペプチドが共有または非共有手段によって連結されている多重ポリペプチド複合体が含まれる。

【0152】

好ましくは、本発明のポリペプチドは、一本鎖ポリペプチドである。

本発明のポリペプチドは、実質的に単離された形であってよい。このポリペプチドは、ポリペプチドの予定の目的を妨げることがない担体または希釈剤と混合されてよいし、なお実質的に単離されたとみなされてよいということは理解されるであろう。本発明のポリペプチドは、実質的に精製された形であってもよく、この場合、それは、概して、標品中の 90% を越える、例えば、95%、98% または 99% のポリペプチドが本発明のポリペプチドである標品中のポリペプチドを構成するであろう。本発明のポリペプチドは、それらの精製を助けるように、例えば、ヒスチジン残基の付加によって修飾されてよい。

20

【0153】

本発明のポリペプチドは、下記のように、合成手段によって（例えば、Geysen et al. , 1996 によって記載のように）または組換えによって生じることができる。

【0154】

好ましい態様において、本発明のアミノ酸配列は、それがその自然環境中にある場合、およびそれが、その自然環境中にもあるその天然のヌクレオチドコーディング配列によって発現されている場合、およびそのヌクレオチド配列が、その自然環境中にもあるその天然のプロモーターの制御下にある場合、それ自体では本発明の天然のヒト S E P を包含しない。参照しやすくするために、本発明者は、この好ましい態様を“非天然アミノ酸配列”と称している。

30

【0155】

本発明の酵素のアミノ酸配列に関する、“変異体”、“ホモログ”、“誘導体”または“フラグメント”という用語には、その配列からのまたはその配列への一つの（またはそれを越える）アミノ酸のいずれかの置換、変異、修飾、交換、欠失または付加が含まれるが、但し、得られた酵素は S E P 活性を有する、好ましくは、添付の配列番号：2 に示される酵素と少なくとも同程度に生物学的に活性であるという条件付きである。具体的には、“ホモログ”という用語は、構造および／または機能に関する相同性を包含する。配列相同性に関して、好ましくは、配列番号：2 に示される配列に、少なくとも 78%、より好ましくは、少なくとも 85%、より好ましくは、少なくとも 90% の相同性が存在する。より好ましくは、配列番号：2 に示される配列に、少なくとも 95%、より好ましくは、少なくとも 98% の相同性が存在する。

40

【0156】

典型的には、本発明の変異体、ホモログ、誘導体またはフラグメントについて、行われうるアミノ酸置換のタイプは、そのアミノ酸配列の疎水性／親水性を維持すべきである。アミノ酸置換は、例えば、1、2 または 3～10、20 または 30 の置換が行われてよいが、但し、その修飾された配列は、本発明による S E P 酵素として作用する能力を保持して

50

いるという条件付きである。アミノ酸置換には、例えば、血漿半減期を増加させるための、天然に存在しない類似体の使用が含まれてよい。

【0157】

本発明のアミノ酸配列は、適当な発現系におけるそれをコードしているヌクレオチド配列の発現によって生じることができる。

更に、または代わりに、タンパク質自体は、化学的方法を用いて、ヒトSEPAミノ酸配列を全部または一部分合成して生じうると考えられる。例えば、ペプチドは、固相法によって合成し、樹脂から切断し、そして分取用高性能液体クロマトグラフィーによって精製することができる（例えば、Creighton (1983) Proteins Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., New York, NY, USA）。これら合成ペプチドの組成は、アミノ酸配列分析またはシーケンス法（例えば、エドマン分解法）によって確認することができる。

10

【0158】

直接ペプチド合成は、種々の固相法を用いて行うことができ（Roberge JY et al, Science, Vol 269, 1995, pp. 202-204）、自動合成は、例えば、ABI431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Boston, MA, USA)を用いて、製造者によって提供される取扱説明書にしたがって行ってよい。更に、ヒトSEPAのアミノ酸配列またはそのいずれか一部分は、直接合成中に変更されてよいしおよび／または化学的方法を用いて、他のサブユニットからの配列またはそのいずれか一部分と一緒に組み合わされて、変異ポリペプチドを生じてよい。

20

【0159】

本発明のもう一つの態様において、ヒトSEPAの天然の、修飾されたまたは組換えの配列は、異種配列に連結されて、融合タンパク質をエンコードすることができる。例えば、SEPA活性の阻害剤のペプチドライブラリーのスクリーニングについて、それは、市販の抗体によって認識される異種エピトープを発現するキメラSEPAタンパク質をエンコードするのが有用でありうる。融合タンパク質は、SEPA配列とその異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含有するように遺伝子操作することもできるので、そのSEPAは、異種部分から切断され且つ精製されることができる。

30

【0160】

ヒトSEPAは、タンパク質精製を容易にするように加えられた一つまたはそれを越える追加のポリペプチドドメインを含む組換えタンパク質として発現されてもよい。このような精製を容易にするドメインには、固定化金属上での精製を可能にするヒスチジンートリプトファンモジュールのような金属キレートペプチド（Porath J, Protein Expr. Purif., Vol 3, 1992, pp. 263-281）、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAG伸長／アフィニティー精製システム中で利用されるドメイン（ImmuneX Corp, Seattle, WA, USA）が含まれるが、これらに制限されるわけではない。この精製用ドメインとSEPAとの間のXA因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego, CA, USA）のような切断可能リンカー配列の包含は、精製を容易にするのに有用である。

40

【0161】

ヒトSEPAの特定のアミノ酸配列を、配列番号：2に示す。しかしながら、本発明は、その特定のアミノ酸配列に少なくとも78%の同一性（より好ましくは、少なくとも85%の同一性）を有するアミノ酸配列が含まれると考えられるSEPAファミリーからの他のメンバーをエンコードしているアミノ酸配列を包含する。

【0162】

本発明のポリペプチドには、本アミノ酸配列のフラグメントおよびそれらの変異体も含まれる。適当なフラグメントは、少なくとも5、例えば、少なくとも10、12、15また

50

は20アミノ酸のサイズであろう。

【0163】

本発明のポリペプチドは、保存置換を含めた一つまたはそれを越える（例えば、少なくとも2、3、5または10の）置換、欠失または挿入を含有するように修飾されてもよい。これら側面を、後の項で考察する。

【0164】

本発明のヌクレオチド配列

本明細書中で用いられる“ヌクレオチド配列”という用語は、オリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列、および（その一部分などの）その変異体、ホモログ、フラグメントおよび誘導体を意味する。このヌクレオチド配列は、センス鎖であれアンチセンス鎖であれ、二本鎖または一本鎖であってよいゲノムまたは合成またはリコンビナント由来であってよいDNAまたはRNAでありうる。

10

【0165】

好ましくは、“ヌクレオチド配列”という用語はDNAを意味する。

より好ましくは、“ヌクレオチド配列”という用語は、組換えDNA技術の使用によって製造されるDNA（すなわち、組換えDNA）を意味する。

【0166】

好ましい態様において、本発明のヌクレオチド配列は、それが、その自然環境中にもあるその天然のプロモーターの制御下にある場合、それ自体ではその自然環境中にある本発明の天然のヌクレオチドコーディング配列を包含しない。参照しやすくするために、本発明者は、この好ましい態様を“非天然ヌクレオチド配列”と称している。

20

【0167】

本発明のヌクレオチド配列は、それらの中に、合成または修飾ヌクレオチドを含んでよい。オリゴヌクレオチドへの多数の異なったタイプの修飾が当該技術分野において知られている。これらには、メチルホスホネートおよびホスホロチオエート主鎖、分子の3'および/または5'末端におけるアクリジンまたはポリリシン鎖の付加が含まれる。本発明の目的について、本明細書中に記載のヌクレオチド配列を、当該技術分野において利用可能ないずれの方法によっても修飾することができるということは理解されるはずである。このような修飾は、本発明のヌクレオチド配列の *in vivo* 活性または寿命を増進させるように行うことができる。

30

【0168】

本発明は、更に、本明細書中に示される配列に相補的であるヌクレオチド配列、またはいずれのそれらの誘導体、フラグメントまたは変異体も包含する。配列がそのフラグメントに相補的である場合、その配列は、他の生物等における類似のコーディング配列を識別するプローブに用いることができる。

【0169】

本発明は、更に、本明細書中に示される配列にハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列、またはいずれのそれらの誘導体、フラグメントまたは変異体も包含する。

【0170】

本発明は、更に、本明細書中に示される配列に相補的である配列にハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列、またはいずれのそれらの誘導体、フラグメントまたは変異体も包含する。

40

【0171】

“変異体”という用語は、本明細書中に示されるヌクレオチド配列にハイブリッド形成することができる配列に相補的である配列も包含する。

好ましくは、“変異体”という用語は、本明細書中に示されるヌクレオチド配列に、ストリンジェント条件下（例えば、65℃および0.1x SSC {1x SSC = 0.15M NaCl, 0.015クエン酸Na₃, pH 7.0}）でハイブリッド形成することができる配列に相補的である配列を包含する。

【0172】

50

本発明は、更に、（本明細書中に示される配列の相補的配列を含めた）本発明のヌクレオチド配列にハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列に関する。

【0173】

本発明は、更に、（本明細書中に示される配列の相補的配列を含めた）本発明のヌクレオチド配列にハイブリッド形成することができる配列に相補的であるヌクレオチド配列に関する。

【0174】

本発明の範囲内に更に含まれるのは、本明細書中に示されるヌクレオチド配列に、中間～最大のストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成することができるポリヌクレオチド配列である。

10

【0175】

好ましい側面において、本発明は、本発明のヌクレオチド配列またはその相補鎖に、ストリンジェント条件下（例えば、65℃および0.1xSSC）でハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列を包含する。

【0176】

典型的な核酸は、他に、ヒトSEPTタンパク質をエンコードし、および配列番号：1または配列番号：5に示されるDNA配列にハイブリッド形成するヌクレオチド配列として特徴付けることができる。好ましいのは、配列番号：1または配列番号：5に示される配列またはその相補鎖に高ストリンジェンシー条件下でハイブリッド形成するヒトSEPTをエンコードしているような配列である。

20

【0177】

好都合には、本発明は、配列番号：1または配列番号：5に示される配列またはその相補鎖のフラグメントにストリンジェント条件下でハイブリッド形成することができる核酸配列を提供する。好ましくは、そのフラグメントは、15～50塩基の長さである。好都合には、それは約25塩基の長さである。

【0178】

本発明の好ましい酵素をコードしているヌクレオチド配列に関して、“変異体”、“ホモログ”、“誘導体”または“フラグメント”という用語には、その配列からのまたはその配列への一つの（またはそれを越える）核酸のいずれかの置換、変異、修飾、交換、欠失または付加が含まれるが、但し、得られたヌクレオチド配列は、SEP活性を有する、好ましくは、配列番号：1または配列番号：5に示される配列によってエンコードされた酵素と少なくとも同程度に生物学的に活性である酵素をコードするまたはコードすることができるという条件付きである。具体的には、“ホモログ”という用語は、構造および／または機能に関する相同性を包含するが、但し、得られたヌクレオチド配列は、SEP活性を有する酵素をコードするまたはコードすることができるという条件付きである。配列相同性に関して、好ましくは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列に、少なくとも83%、より好ましくは、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%の相同性が存在する。より好ましくは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列に、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%の相同性が存在する。配列相同性に関して、好ましくは、配列番号：1または配列番号：5に示される配列に、少なくとも83%、より好ましくは、少なくとも87%、より好ましくは、少なくとも90%の相同性が存在する。より好ましくは、配列番号：1または配列番号：5に示される配列に、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%の相同性が存在する。

30

40

【0179】

示されるように、本発明は、ヒトSEPTをエンコードしているDNA配列（好ましくは、cDNA配列）に関する。具体的には、本発明は、ヒトSEPTをエンコードしているcDNA配列に関する。

【0180】

本発明は、更に、配列番号：1または配列番号：5に示されるDNA配列またはその対立

50

遺伝子変異を含むDNAセグメントに関する。

本発明は、更に、前述のDNA配列またはそれらの対立遺伝子変異が包含された宿主細胞中での発現によって生じるポリペプチドに関する。

【0181】

本発明は、更に、配列番号：1または配列番号：5に示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を含むDNAに関し、それを提供する。

本発明は、更に、配列番号：1または配列番号：5に示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を含む非天然DNAに関する。

【0182】

本発明の極めて好ましい側面は、配列番号：1または配列番号：5に示されるDNA配列またはその対立遺伝子変異を含む組換えDNAに関する。 10

本発明のポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをエンコードしている核酸配列が含まれる。一定範囲の異なったポリヌクレオチドが、ある与えられたアミノ酸配列を遺伝コードの縮重の結果としてエンコードするということは理解されるであろう。

【0183】

本明細書中に示されるアミノ酸配列の情報により、本発明のポリペプチドをエンコードするcDNAおよび／またはゲノムクローンなどの部分および完全長の核酸配列を案出することは可能である。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書中に示されるアミノ酸配列をエンコードしている配列に指向するように設計されたプライマーを用いる縮重ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて得ることができる。これらプライマーは、典型的には、多数の縮重位置を含有するであろう。しかしながら、縮重を最小限にするために、たった一つのトリプレットによってコードされるメチオニンのようなアミノ酸を含有する本明細書中に示されるアミノ酸配列の領域をエンコードする配列が選択されるであろう。更に、配列は、PCR法の鋳型DNAとしてその核酸が用いられる生物中でのコドン使用を考慮するように選択されるであろう。PCRは、既知の配列に対する単一配列（非縮重）プライマーを含む配列をクローニングするのに用いられるものより低いストリンジェンシー条件で用いられるであろう。 20

【0184】

次に、本発明のポリペプチドフラグメントをエンコードする、PCRによって得られた核酸配列を用いて、ハイブリダイゼーションライブラリースクリーニング技術を用いてより大きな配列を得ることができる。例えば、PCRクローンを、放射性原子で標識して、他の種、好ましくは、他の哺乳動物種からのcDNAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングするのに用いることができる。ハイブリダイゼーション条件は、典型的には、中～高ストリンジェンシー条件（例えば、約50℃～約60℃において0.03M塩化ナトリウムおよび0.03Mクエン酸ナトリウム）であろう。 30

【0185】

アミノ酸配列の全部または一部分をエンコードしている縮重核酸プローブは、他の種、好ましくは、他の哺乳動物種からのcDNAおよび／またはゲノムライブラリーをプローブするのに用いることもできる。しかしながら、PCR法を行って、追加のスクリーニング法で用いるための単一配列を最初に得ることが好適である。 40

【0186】

本発明により、ヒトSEP、ポリペプチドのフラグメント、融合タンパク質またはその機能的均等物をエンコードするポリヌクレオチド配列は、適当な宿主細胞中でのヒトSEPの発現を指示する組換えDNA分子を生じるのに用いることができる。遺伝コードの固有の縮重のために、実質的に同じまたは機能的に均等なアミノ酸配列をエンコードする他のDNA配列は、ヒトSEPをクローン化し且つ発現するのに用いることができる。当業者によって理解されるように、天然に存在しないコドンを含む、ヒトSEPをエンコードしているヌクレオチド配列を生じることは好都合でありうる。特定の原核生物または真核生物宿主に好適なコドン（Murray E et al, (1989), Nuc. Acids Res., 17:477-508）は、例えば、ヒトSEP発現の速度を増加さ 50

せるように、または天然に存在する配列から生じる転写物より長い半減期などの望ましい性状を有する組換えRNA転写物を生じるように選択することができる。

【0187】

上記の技法を用いて得られる本発明のポリヌクレオチド配列は、上記の技法を用いて更に別の相同配列および変異体を得るのに用いることができる。それらは、例えば、それらポリヌクレオチド配列が発現されている特定の宿主細胞についてコドン選択を最適にするように、種々の宿主細胞系において本発明のポリペプチドを発現させる場合に用いるために修飾されてもよい。他の配列変化は、制限酵素認識部位を導入するために、またはそれらポリヌクレオチドによってエンコードされるポリペプチドの性状または機能を変更するために望まれることがありうる。

10

【0188】

本発明によって用いることができる変更されたヒトSEPポリヌクレオチド配列には、同じまたは機能的に均等なSEPをエンコードするポリヌクレオチドを生じる異なるヌクレオチド残基の欠失、挿入または置換が含まれる。そのタンパク質は、サイレント変化を生じ且つ機能的に均等なSEPを生じるアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を有してもよい。計画的なアミノ酸置換は、SEPの生物学的活性が保持される限りにおいて、それら残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および／または両親媒性の性質の類似性に基づいて行われてよい。例えば、陰電荷アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ；陽電荷アミノ酸には、リシンおよびアルギニンが含まれ；そして類似した親水性値を有する非荷電極性頭部基を含むアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが含まれる。

20

【0189】

本発明の範囲内に含まれるのは、ヒトSEPの対立遺伝子である。本明細書中で用いられる“対立遺伝子”または“対立遺伝子配列”は、ヒトSEPの別の形である。対立遺伝子は、突然変異、すなわち、核酸配列の変化によって生じ、そして概して、変更されたmRNAまたはポリペプチドを生じるが、その構造または機能は変更されていてよいしまたはされていない。いずれの与えられた遺伝子も、対立遺伝子形を有しない、または一つもしくは多数有していてもよい。対立遺伝子を生じる共通の突然変異変化は、概して、アミノ酸の欠失、付加または置換による。これらの変化のタイプの各々は、ある与えられた配列中において単独でまたは他のものとの組合せで1回またはそれを超えて起こりうる。

30

【0190】

本発明のヌクレオチド配列は、遺伝子産物のクローニング、プロセッシングおよび／または発現を修飾する変更が含まれるがこれに制限されるわけではない種々の理由でヒトSEPコーディング配列を変更するために遺伝子操作することができる。例えば、突然変異を、当該技術分野において周知である技法、例えば、部位特異的突然変異誘発を用いて導入して、新しい制限部位を挿入する、グリコシル化パターンを変更するまたはコドン選択を変化させることができる。

【0191】

本発明のポリヌクレオチドは、プライマー、例えば、PCRプライマー、代わりの増幅反応のためのプライマー、プローブであって、例えば、放射性または非放射性標識を用いて慣用的な手段によって明らかになる標識で標識されたものを生じるのに用いることができるし、またはそれらポリヌクレオチドは、ベクター中にクローン化することができる。このようなプライマー、プローブおよび他のフラグメントは、少なくとも15、好ましくは、少なくとも20、例えば、少なくとも25、30または40ヌクレオチドの長さであろうが、これらも、本明細書中で用いられる本発明のポリヌクレオチドという用語によって包含される。

40

【0192】

本発明のポリヌクレオチドまたはプライマーは、明らかになる標識を有してよい。適当な

50

標識には、 $^3\text{ }^2\text{ P}$ または $^3\text{ }^5\text{ S}$ のような放射性同位体、酵素標識、またはビオチンのような他のタンパク質標識が含まれる。このような標識は、本発明のポリヌクレオチドまたはプライマーに加えることができるし、当該技術分野において知られている技法によって検出することができる。

【0193】

本発明によるDNAポリヌクレオチドのようなポリヌクレオチドおよびプライマーは、組換えによって、合成によって、または当業者に利用可能ないずれの手段によっても製造することができる。それらも、標準的な技法によってクローン化することができる。

【0194】

概して、プライマーは、所望の核酸配列の一度に一つのヌクレオチドの段階的製造を含む合成手段によって製造されるであろう。自動化された技法を用いてこれを行う技法は、当該技術分野において容易に利用可能である。

10

【0195】

より長いポリヌクレオチドは、概して、組換え手段を用いて、例えば、PCRクローニング法を用いて製造されるであろう。これは、クローン化することが望まれるヌクレオチド配列の領域に（例えば、約15～30ヌクレオチドの）1対のプライマーを製造し、それらプライマーを、例えば、真菌、植物または原核細胞から得られるmRNAまたはcDNAと接触させ、所望の領域の増幅をもたらす条件下でポリメラーゼ連鎖反応を行い、増幅されたフラグメントを（例えば、反応混合物をアガロースゲル上で精製することによって）単離し、そして増幅されたDNAを回収することを含むであろう。それらプライマーは、適当な制限酵素認識部位を含有するように設計することができるので、増幅されたDNAは、適当なクローニングベクター中にクローン化することができる。

20

【0196】

DNA分子は、細胞内安定性および半減期を増加させるように修飾されてよい。可能な修飾には、その分子の5'および/または3'末端のフランキング配列の付加、またはその分子の主鎖中でのホスホジエステラーゼ結合よりむしろホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が含まれるが、これらに制限されるわけではない。

【0197】

初めの方で述べられたように、本発明は、更に、配列番号：1または配列番号：5に示される配列またはその対立遺伝子変異の全部または一部分にハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列に関する。これらヌクレオチド配列は、アンチセンス法において、ヒトSEP発現を修飾するために用いてもよい。或いは、これら配列（またはそれらの一部分）は、プローブとして用いることができるし、またはPCRプライマーとして用いられる場合のこのような配列の全部または一部分を増幅させるのに用いることができる。

30

【0198】

組換えDNA配列に加えて、ゲノム配列も、薬物発見の場合に有用である。その翻訳されたタンパク質を阻害するよりもむしろ、特定のイソ型のmRNA転写を阻害することが有益でありうる。これは、スプライス変異体が存在し、それら異なったスプライス変異体が異なったプロモーターから転写されうる場合、ヒトSEPについても当てはまりうる。

【0199】

本発明のもう一つの有用性は、DNA配列が、いったん知られると、イソ酵素またはスプライス変異体の特異的に検出する検定を設計するのに必要とされる情報を与えるということである。イソ酵素特異的PCRプライマー対は、イソ酵素またはスプライス変異体の特異的DNA配列の情報に完全に依存する検定の唯一の例である。このような検定は、特定の疾患状態への各々のイソ酵素の組織分布および生物学的関係を評価するイソ酵素についてのmRNAの検出を可能にする。それは、唯一のイソ酵素を天然に発現しうる細胞系の同定、すなわち、組換え遺伝子を発現する必要性をなくするかもしれない発見も可能にする。特定のヒトSEPイソ酵素が特定の疾患状態に関連していることが示されるならば、本発明は、イソ酵素mRNAの存在を検出する診断用検定の設計において有益であると考えられる。

40

50

【0200】

ヒトSE P酵素をエンコードしているヌクレオチド配列の生体試料中での異常レベルは、核酸欠失または突然変異のような染色体異常に反映することがありうる。したがって、ヒトSE P酵素をエンコードしているヌクレオチド配列は、ヒトSE Pをエンコードしている遺伝子中の欠失、突然変異または染色体転座のような染色体異常を診断用に検出するのに用いることができるプローブの基準を提供する。ヒトSE P遺伝子発現は、このような疾患状態において変更されることがありうるし、またはヒトSE Pをエンコードしている遺伝子の領域中に存在する染色体異常がありうる。

【0201】

本発明の別の態様において、ヒトSE Pのコーディング配列は、当該技術分野において周知の化学的方法を用いて全部または一部分合成されうる (Caruthers M H et al, (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser., pp. 215-223; Horn T et al, (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser., pp. 225-232 を参照されたい)。

【0202】

天然に存在する

本明細書中で用いられる“天然に存在する”は、天然に見出されるアミノ酸配列を含むヒトSE Pに関する。

【0203】

単離された／精製された

本明細書中で用いられる“単離された”および“精製された”という用語は、核酸配列かまたはアミノ酸配列の分子であって、それらの自然環境から取り出され且つそれらが天然に関連している少なくとも一つの他の成分から単離されまたは分離される分子に関する。

【0204】

生物学的に活性な

本明細書中で用いられる“生物学的に活性な”は、天然に存在するヒトSE Pの（同程度の必要はないが）類似した構造機能および／または（同程度の必要はないが）類似した調節機能および／または（同程度の必要はないが）類似した生化学的機能および／または（同程度の必要はないが）免疫学的活性を有する、組換えヒトSE Pのような本発明によるヒトSE Pに関する。具体的には、本発明のヒトSE Pは、一定のペプチド基質をタンパク質分解によって切断する能力を有し、これは、本発明のヒトSE P酵素の特徴的な活性の一つである。

【0205】

免疫学的活性

本明細書中で用いられる“免疫学的活性”は、適当な動物または細胞中において特異的免疫応答を引き起こし且つ特異的抗体と結合する、天然の、組換えまたは合成のヒトSE Pまたはそのいずれかのオリゴペプチドの能力として定義される。

【0206】

誘導体

アミノ酸配列に関して本明細書中で用いられる“誘導体”という用語には、ヒトSE Pの化学修飾が含まれる。このような修飾を代表するものは、アルキル基、アシル基またはアミノ基による水素の交換であると考えられる。

【0207】

欠失

本明細書中で用いられる“欠失”は、それぞれ一つまたはそれを越えるヌクレオチドまたはアミノ酸の残基を欠いているヌクレオチド配列かまたはアミノ酸配列の変化として定義される。

【0208】

挿入／付加

本明細書中で用いられる“挿入”または“付加”は、天然に存在するヒトSE Pと比較し

て、それぞれ一つまたはそれを越えるヌクレオチドまたはアミノ酸の残基の付加を生じているヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の変化である。

【0209】

置換

本明細書中で用いられる“置換”は、それぞれ異なったヌクレオチドまたはアミノ酸による一つまたはそれを越えるヌクレオチドまたはアミノ酸の交換によって生じる。

【0210】

ホモログ

本発明のヌクレオチド配列および本発明のアミノ酸配列に関する“ホモログ”という用語は、それら配列の対立遺伝子変異と同意語でありうる。

10

【0211】

具体的には、本明細書中で用いられる“相同性”という用語は、“同一性”という用語と等しいことがありうる。ここでは、本発明のヌクレオチド配列および本発明のアミノ酸配列に関する配列相同性を、いずれか一つまたはそれを越える配列と別の配列との、その他の配列がヌクレオチド配列への少なくとも83%の同一性およびアミノ酸配列への少なくとも78%の同一性を有するかどうか確かめる簡単な“眼球”比較（すなわち、厳密な比較）によって決定することができる。相対配列相同性（すなわち、配列同一性）は、二つまたはそれを越える配列間の相同性百分率（%）を計算することができる市販の計算機プログラムによって決定することもできる。このような計算機プログラムの典型的な例は、CLUSTALおよびBLASTである。

20

【0212】

相同性百分率（%）は、連続した配列、すなわち、一つの配列が他の配列と並んでいる配列にわたって計算することができ、一つの配列中の各アミノ酸と他の配列中の該当するアミノ酸とで、一度に一つの残基を直接的に比較することができる。これを、“ギャップなし（ungapped）”アラインメントと称する。典型的には、このようなギャップなしアラインメントは、比較的少数の残基（例えば、50未満の連続したアミノ酸）にわたってのみ行われる。

【0213】

これは、極めて簡単な且つ首尾一貫した方法であるが、例えば、それ以外に一致する配列対の場合、一つの挿入または欠失が続くアミノ酸残基をアラインメントからはずれさせ、それによって、全体的なアラインメントが行われる場合に相同性%を大きく減少させる可能性があるということを考慮することができない。したがって、大部分の配列比較法は、全相同性スコアを過度に不利にすることなく、可能な挿入および欠失を考慮する最適アラインメントを生じるように設計される。これは、配列アラインメント中に“ギャップ”を挿入して、局部相同性を最大にすることを試みることによって達せられる。

30

【0214】

しかしながら、これら一層複雑な方法は、アラインメント中にある各々のギャップに“ギャップペナルティー”を振り分けるので、一致するアミノ酸の同数について、可能な限り少ないギャップを含む配列アラインメントは、二つの比較される配列間のより高い関係性に反映し、多数のギャップを含むものより高いスコアに達するであろう。典型的には、ギャップの存在について比較的高いコストおよびギャップ中の次の残基各々についてより小さいペナルティーを課す“アフィンギャップコスト（affine gap costs）”を用いる。これは、最も一般的に用いられるギャップ評点システムである。高いギャップペナルティーは、当然ながら、より少ないギャップを含む最適のアラインメントを生じるであろう。大部分のアラインメントプログラムは、ギャップペナルティーを変更させる。しかしながら、配列比較のためにこのようなソフトウェアを用いる場合、デフォルト値を用いることが好適である。例えば、GCG Wisconsin Best fit パッケージ（下を参照されたい）を用いる場合、アミノ酸配列についてのデフォルト値ギャップペナルティーは、ギャップに-12および伸長毎に-4である。

40

【0215】

50

したがって、最大相同性%の計算は、最初に、ギャップペナルティを考慮した最適アラインメントの作成を必要とする。このようなアラインメントを実施するのに適当な計算機プログラムは、GCG Wisconsin Bestfit パッケージ (University of Wisconsin, U. S. A. ; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387) である。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例には、BLAST パッケージ (Ausubel et al., 1999 ibid-Chapter 18 を参照されたい)、FASTA (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) および GENEWORKS 比較ツールセット (suite of comparison tools) が含まれるが、これらに制限されるわけではない。BLAST および FASTA は両方とも、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である (Ausubel et al., 1999 ibid, pages 7-58 to 7-60 を参照されたい)。しかしながら、若干の応用には、GCG Bestfit プログラムを用いるのが好適である。

10

【0216】

最終相同性%は、同一性の点から測定することができるが、いくつかの場合、アラインメント操作自体、典型的には、全か無か (all-or-nothing) の対比較に基づいていない。その代わり、化学的類似性または進化論的距離に基づく各々の対合比較にスコアを振り分ける階級化した (scaled) 類似性スコアマトリックスを用いる。一般的に用いられるこのようなマトリックスの一例は、BLAST プログラムセットのデフォルト値マトリックスである BLOSUM62 マトリックスである。GCG Wisconsin プログラムは、概して、パブリックデフォルト値、または供給される場合、カスタム記号比較表を用いる (更に詳細については使用者マニュアルを参照されたい)。GCG パッケージにパブリックデフォルト値、または他のソフトウェアの場合、BLOSUM62 のようなデフォルト値マトリックスを用いるのは好適である。

20

【0217】

ソフトウェアで最適アラインメントが作成されたら、相同性%、好ましくは、配列同一性%を計算することは可能である。そのソフトウェアは、典型的に、これを配列比較の一部として行い、数値結果を生じる。

【0218】

示されるように、いくつかの応用について、配列相同性 (または同一性) は、いずれか適当な相同性アルゴリズムを用いて、例えば、デフォルト値パラメーターを用いて決定することができる。配列データベースの類似性検索における基本的な問題点の考察については、Altschul et al., (1994) Nature Genetics 6:119-129 を参照されたい。いくつかの応用について、BLAST アルゴリズムを、デフォルト値に設定されるパラメーターと一緒に用いる。BLAST アルゴリズムは、http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html において詳細に記載されている。好都合には、BLAST によって評価される場合の“実質的な相同性”は、少なくとも約 e^{-7} 、好ましくは、少なくとも約 e^{-9} 、そして最も好ましくは、 e^{-10} またはそれより低い EXPECT 値に合う配列に等しい。BLAST 検索における EXPECT のデフォルトの閾値は、通常は 10 である。

30

40

【0219】

配列同一性を決定する場合にギャップペナルティを用いることが可能ならば、好ましくは、次のパラメーターを用いる。

【0220】

【表1】

BLAST用	
ギャップオープン	5
ギャップ伸長	2

CLUSTAL用	DNA	タンパク質	
ワードサイズ	2	1	K三重
ギャップペナルティー	10	10	
ギャップ伸長	0.1	0.1	

10

二つの配列間の同一性および類似性を決定する他の計算機プログラム法には、GCGプログラムパッケージ（Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387）およびFASTA（Altschul et al., 1990, J. Molec. Biol., pp. 403-410）が含まれるが、これらに制限されるわけではない。

【0221】

ポリペプチド変異体および誘導体

本発明のアミノ酸配列に関する“変異体”または“誘導体”という用語には、その配列からのまたは配列への一つの（またはそれを越える）アミノ酸のいずれかの置換、変異、修飾、交換、欠失または付加が含まれるが、但し、得られたアミノ酸配列はヒトSEP活性を有する、好ましくは、配列番号：2に示されるポリペプチドと少なくとも同じ活性を有するという条件付きである。

20

【0222】

本発明の配列は、本発明で用いるために修飾されてよい。典型的には、その配列のヒトSEP活性を維持する修飾が行われる。アミノ酸置換は、修飾された配列がヒトSEP活性を保持するという条件で、例えば、1、2または3～10、20または30の置換を行ってよい。アミノ酸置換には、例えば、治療的に投与されるポリペプチドの血漿半減期を増加させるための天然に存在しない類似体の使用が含まれる。

【0223】

保存的置換は、例えば、下の表にしたがって行われてよい。第二列の同じブロック中、好ましくは、第三列の同じ行中のアミノ酸は、互いに置換されてよい。

30

【0224】

【表2】

脂肪族	無極性	GAP
		ILV
	極性－非荷電	CSTM
		NQ
	極性－荷電	DE
		KR
芳香族		HFWY

40

上に示されたように、本発明のタンパク質は、典型的に、組換え手段によって、例えば、本明細書中に記載のように、および／または固相合成のような当業者に周知の技法を用いた合成手段を用いることによって製造される。このような配列の変異体および誘導体には、融合タンパク質であって、少なくとも、別のアミノ酸配列に（直接的にまたは間接的に）連結されている本発明のアミノ酸配列を含む融合タンパク質が含まれる。これら他のアミノ酸配列は、時々、融合タンパク質パートナーと称されるが、典型的には、本発明のア

50

ミノ酸配列の抽出および精製を助けるような好ましい官能性を与えるであろう。融合タンパク質パートナーの例には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、6xHis、GAL4 (DNA結合および／または転写活性化ドメイン) およびβ-ガラクトシダーゼが含まれる。融合タンパク質パートナーと本発明のタンパク質配列との間に、後者の除去を可能にするようにタンパク質分解切断部位を含むことも好都合でありうる。好ましくは、融合タンパク質パートナーは、本発明のタンパク質の機能を妨害しないであろう。

【0225】

ポリヌクレオチド変異体および誘導体

本発明のヌクレオチド配列に関する“変異体”または“誘導体”という用語には、その配列からのまたは配列への一つの（またはそれを越える）核酸のいずれかの置換、変異、修飾、交換、欠失または付加が含まれるが、但し、得られたヌクレオチド配列は、ヒトSE P活性を有する、好ましくは、配列番号：1または配列番号：5に示される配列によってエンコードされるポリペプチドと少なくとも同じ活性を有するポリペプチドをコードするという条件付きである。 10

【0226】

上に示されたように、配列相同性に関して、好ましくは、配列番号：1または配列番号：5に示される配列に少なくとも83%、より好ましくは、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%の相同性がある。より好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも98%の相同性がある。ヌクレオチド相同性比較は、上記のように行うことができる。若干の応用について、好ましい配列比較プログラムは、上記のGCG Wisconsin Bestfit プログラムである。デフォルトの評点マトリックスは、一致するヌクレオチド各々に10および各々のミスマッチに-9の対合値を有する。各々のヌクレオチドについて、デフォルトのギャップ生成ペナルティーは-50であり、デフォルトのギャップ伸長ペナルティーは-3である。 20

【0227】

本明細書中で用いられる“変異体”、“ホモログ”、“フラグメント”および“誘導体”という用語は、それら配列の対立遺伝子変異を包含する。
“変異体”という用語は、本明細書中に示されるヌクレオチド配列にハイブリッド形成することができる配列に相補的である配列も包含する。 30

【0228】

ハイブリダイゼーション

本明細書中で用いられる“ハイブリダイゼーション”という用語には、“核酸の鎖が塩基対合によって相補鎖と接合する過程” (Coombs J (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York NY)、並びに Dieffenbach CW and Dveksler (1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, USA) に記載のPCR技術で行われるような増幅の過程が含まれるであろう。

【0229】

ハイブリダイゼーション条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA, USA) に示されるように、核酸結合性複合体の融解温度 (T_m) に基づき、下に説明されるように定義される“ストリンジェンシー”を与える。 40

【0230】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、その下でポリ核酸ハイブリッドが安定である条件を意味する。このような条件は、当業者に明らかである。当業者に知られているように、ハイブリッドの安定性は、配列相同性が1%減少する毎に約1~1.5℃低下するハイブリッドの融解温度 (T_m) に反映される。概して、ハイブリッドの安定性は、 50

ナトリウムイオン濃度および温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応を、より高いストリンジェンシーの条件下で行った後、いろいろなストリンジェンシーの洗浄を行う。

【0231】

本明細書中で用いられるように、高ストリンジェンシーとは、 1 M Na^+ 中において $65\sim 68^\circ\text{C}$ で安定なハイブリッドを形成するそれら核酸配列だけのハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。

【0232】

最大ストリンジェンシーは、典型的に、ほぼ $T_m - 5^\circ\text{C}$ (プローブの T_m より 5°C 低い温度) で生じる。

高ストリンジェンシーは、プローブの T_m より約 $5^\circ\text{C}\sim 10^\circ\text{C}$ 低い温度で生じる。高ストリンジェンシー条件は、例えば、 $6\times\text{SSC}$ 、 $5\times$ デンハート (Denhardt's)、 1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、 0.1 Na^+ ピロリン酸および非特異的競合物質としての 0.1 mg/ml 変性サケ精子 DNA を含有する水溶液中でのハイブリダイゼーションによって提供されうる。ハイブリダイゼーション後、高ストリンジェンシー洗浄は、数段階で、 $0.2\sim 0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中におけるそのハイブリダイゼーション温度で (約 30 分間) の最終洗浄を含んで行われてよい。

【0233】

中程度または中間のストリンジェンシーは、典型的に、プローブの T_m より約 $10^\circ\text{C}\sim 20^\circ\text{C}$ 低い温度で生じる。

低ストリンジェンシーは、典型的に、プローブの T_m より約 $20^\circ\text{C}\sim 25^\circ\text{C}$ 低い温度で生じる。

【0234】

当業者に理解されるように、最大ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、同一のポリヌクレオチド配列を識別するまたは検出するのに用いることができるが、中間の (または低) ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、類似したまたは関連したポリヌクレオチド配列を識別するまたは検出するのに用いることができる。

【0235】

中程度のストリンジェンシーとは、上記の溶液中であるが約 $60\sim 62^\circ\text{C}$ でのハイブリダイゼーションに均等な条件を意味する。その場合、最終洗浄は、 $1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中においてそのハイブリダイゼーション温度で行われる。

【0236】

低ストリンジェンシーとは、上記の溶液中において約 $50\sim 52^\circ\text{C}$ でのハイブリダイゼーションに均等な条件を意味する。その場合、最終洗浄は、 $2\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中においてそのハイブリダイゼーション温度で行われる。

【0237】

これら条件が、種々の緩衝液、例えば、ホルムアミド基剤緩衝液および温度を用いて適応され、および再現されてもよいということは理解される。デンハート溶液および SSC は、他の適当なハイブリダイゼーション緩衝液と同様、当業者に周知である (例えば、Sambrook, et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; または Ausubel, et al., eds. (1990) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. を参照されたい)。最適ハイブリダイゼーション条件は、プローブの長さおよび GC 含量も役割を果たしているので、経験的に決定されるべきである。

【0238】

本明細書中に示されるヌクレオチド配列またはそれらの相補鎖に選択的にハイブリッド形成することができる本発明のポリヌクレオチドは、概して、本明細書中に示される該当するヌクレオチド配列に、少なくとも 20 個、好ましくは、少なくとも 25 個または 30 個

10

20

30

40

50

、例えば、少なくとも40個、60個または100個またはそれを越える連続したヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも83%、好ましくは、少なくとも85%または90%、そしてより好ましくは、少なくとも95%または98%相同であろう。

【0239】

“選択的にハイブリッド形成できる”という用語は、プローブとして用いられるポリヌクレオチドが、本発明の標的ポリヌクレオチドがそのプローブに、バックグラウンドを有意に上回るレベルでハイブリッド形成することが判っている条件下で用いられるということの意味する。このバックグラウンドハイブリダイゼーションは、例えば、スクリーニングされているcDNAまたはゲノムDNAライブラリーの他のポリヌクレオチドのために生じることがありうる。この場合、バックグラウンドとは、そのプローブとライブラリーの非特異的DNAメンバーとの間の相互作用によって生じる、標的DNAで認められる特異的相互作用の10倍未満、好ましくは、100倍未満と同程度の強さであるレベルのシグナルを意味する。この相互作用の強度は、例えば、プローブを、例えば、³²Pで放射性標識することによって測定することができる。

10

【0240】

好ましい側面において、本発明は、本発明のいずれか一つまたはそれを越えるヌクレオチド配列に、ストリンジェント条件下（例えば、65℃および0.1xSSC {1xSSC=0.15M NaCl, 0.015クエン酸Na₃, pH7.0}）でハイブリッド形成することができるヌクレオチド配列を包含する。

【0241】

本発明のポリヌクレオチドが二本鎖である場合、その二重らせんの両鎖は、個々にかまたは組合せて、本発明によって包含される。このポリヌクレオチドが一本鎖である場合、そのポリヌクレオチドの相補的配列も本発明の範囲内に含まれるということは理解されるはずである。

20

【0242】

本発明の配列に100%相同ではないが、本発明の範囲内であるポリヌクレオチドは、多数の方法によって得ることができる。本明細書中に記載の配列の他の変異体は、例えば、一定範囲の個体、例えば、異なった集団からの個体から作られるDNAライブラリーをプローブすることによって得ることができる。更に、他のウイルス／細菌の、または細胞性のホモログ、特に、哺乳動物細胞（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマおよび霊長類の細胞）中に見出される細胞性ホモログを得ることができ、このようなホモログおよびそれらのフラグメントは、概して、配列番号：1または配列番号：5に示される配列に選択的にハイブリッド形成することができるであろう。このような配列は、他の動物種から作られるcDNAライブラリーまたはそれに由来するゲノムDNAライブラリーをプローブし、そしてこのようなライブラリーを、中～高ストリンジェンシー条件下において、配列番号：1または配列番号：5に示される配列の全部または一部分を含むプローブでプローブすることによって得ることができる。同様の考え方が、本発明のポリペプチド配列またはヌクレオチド配列の種ホモログおよび対立遺伝子変異体を得るのに当てはまる。

30

【0243】

変異体および系統／種ホモログは、本発明の配列中の保存アミノ酸配列をエンコードしている変異体およびホモログ中の配列に指向するように設計されるプライマーを用いるであろう縮重PCRを用いて得ることもできる。保存配列は、例えば、数種類の変異体／ホモログからのアミノ酸配列を整列することによって予想することができる。配列アラインメントは、当該技術分野において知られている計算機ソフトウェアを用いて行うことができる。例えば、GCG Wisconsin PileUp プログラムが広く用いられている。

40

【0244】

縮重PCRで用いられるプライマーは、一つまたはそれを越える縮重位置を含有するであろうし、しかも既知の配列に対して単一配列プライマーで配列をクローニングするのに用いられるものより低いストリンジェンシー条件で用いられるであろう。

50

【0245】

或いは、このようなポリヌクレオチドは、特徴的な配列の部位特異的突然変異誘発によって得ることができる。これは、例えば、そのポリヌクレオチド配列が発現されている特定の宿主細胞についてコドン選択を最適にするために配列にサイレントコドン変化が必要とされる場合に有用でありうる。他の配列変化は、制限酵素認識部位を導入するために、またはそれらポリヌクレオチドによってエンコードされるポリペプチドの性状または機能を変更するために望まれることがありうる。

【0246】

本発明のポリヌクレオチドは、プライマー、例えば、PCRプライマー、代わりの増幅反応のためのプライマー、プローブであって、例えば、放射性または非放射性標識を用いて慣用的な手段によって明らかになる標識で標識されたものを生じるのに用いることができるし、またはそれらポリヌクレオチドは、ベクター中にクローン化することができる。このようなプライマー、プローブおよび他のフラグメントは、少なくとも15、好ましくは、少なくとも20、例えば、少なくとも25、30または40ヌクレオチドの長さであろうが、これらも、本明細書中で用いられる本発明のポリヌクレオチドという用語によって包含される。

【0247】

本発明によるDNAポリヌクレオチドおよびプローブのようなポリヌクレオチドは、組換えによって、合成によって、または当業者に利用可能ないずれの手段によっても製造することができる。それらも、標準的な技法によってクローン化することができる。

【0248】

概して、プライマーは、所望の核酸配列の一度に一つのヌクレオチドの段階的製造を含む合成手段によって製造されるであろう。自動化された技法を用いてこれを行う技法は、当該技術分野において容易に利用可能である。

【0249】

より長いポリヌクレオチドは、概して、組換え手段を用いて、例えば、PCRクローニング法を用いて製造されるであろう。これは、クローン化することが望まれる配列の領域に隣接する（例えば、約15～30ヌクレオチドの）1対のプライマーを製造し、それらプライマーを、動物またはヒト細胞から得られるmRNAまたはcDNAと接触させ、所望の領域の増幅をもたらす条件下でポリメラーゼ連鎖反応を行い、増幅されたフラグメントを（例えば、反応混合物をアガロースゲル上で精製することによって）単離し、そして増幅されたDNAを回収することを含むであろう。それらプライマーは、適当な制限酵素認識部位を含有するように設計してよく、増幅されたDNAは、適当なクローニングベクター中にクローン化することができる。

【0250】

調節配列

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、選択された宿主細胞によるなどのコーディング配列の発現を提供することができる調節配列に機能可能に連結している。例として、本発明は、このような調節配列に機能可能に連結している本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを包含する、すなわち、このベクターは発現ベクターである。

【0251】

“機能可能に連結している”という用語は、記載の化合物が、それらを予定の方式で機能させる関係にある並列を意味する。コーディング配列に“機能可能に連結している”調節配列は、そのコーディング配列の発現が、制御配列に適合しうる条件下で達せられるように連結している。

【0252】

“調節配列”という用語には、プロモーターおよびエンハンサーおよび他の発現調節シグナルが含まれる。

“プロモーター”という用語は、当該技術分野の通常の意味に、例えば、RNAポリメラーゼ結合部位に用いられる。

10

20

30

40

50

【0253】

本発明のポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチドの増進された発現は、異種調節領域、例えば、プロモーター、分泌リーダーおよびターミネーター領域の選択によって達せられてもよく、これは、選択された発現宿主からの目的のタンパク質の発現および所望ならば分泌レベルを増加させるのにおよび／または本発明のポリペプチドの発現の誘導可能な制御を行うのに役立つ。

【0254】

好ましくは、本発明のヌクレオチド配列は、少なくともプロモーターに機能可能に連結してよい。

本発明のポリペプチドをエンコードしている遺伝子本来のプロモーターとは別に、他のプロモーターを用いて、本発明のポリペプチドの発現を支配することができる。そのプロモーターは、所望の発現宿主中での本発明のポリペプチドの発現を支配する場合のその効率について選択されてよい。

【0255】

もう一つの態様において、構成性プロモーターが、本発明の所望のポリペプチドの発現を支配するために選択されてよい。このような発現構築物は、それが、誘導性基質を含有する培地上で発現宿主を培養する必要性を回避するので、追加の利点を与えることがありうる。

【0256】

真菌発現宿主で用いるのに好適である強力な構成性および／または誘導可能プロモーターの例は、キシラナーゼ (xlnA)、フィターゼ、ATPシンテターゼ、サブユニット9 (oliC)、トリオースリン酸イソメラーゼ (tpi)、アルコールデヒドロゲナーゼ (AdhA)、 α -アミラーゼ (amy)、アミログルコシダーゼ (AG-glaA 遺伝子より)、アセトアミダーゼ (amdS) およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (gpd) のプロモーターについて真菌遺伝子から入手可能であるものである。

【0257】

強力な酵母プロモーターの例は、アルコールデヒドロゲナーゼ、ラクターゼ、3-ホスホグリセリン酸キナーゼおよびトリオースリン酸イソメラーゼについての遺伝子から入手可能なものである。

【0258】

強力な細菌プロモーターの例は、 α -アミラーゼおよびSPO2のプロモーター、並びに細胞外プロテアーゼ遺伝子からのプロモーターである。

ハイブリッドプロモーターは、発現構築物の誘導可能な調節を改善するのに用いることもできる。

【0259】

プロモーターには、更に、適当な宿主中での発現を確実にするまたは増加させる特徴が含まれうる。例えば、それら特徴は、Pribnow Box またはTATAボックスのような保存領域でありうる。プロモーターは、他の配列も含有して、本発明のヌクレオチド配列の発現レベルに影響を与えること（維持すること、増進すること、減少させることなど）もできる。例えば、適当な他の配列には、Shl-イントロンまたはADHイントロンが含まれる。他の配列には、温度、化学物質、光またはストレス誘導性要素のような誘導性要素が含まれる。更に、転写または翻訳を増進させる適当な要素が存在してよい。後者の要素の一例は、TMV 5' シグナル配列である (Sleat, Gene, 217, [1987], pp. 217-225; および Dawson, Plant Mol. Biol., 23, [1993], p. 97 を参照されたい)。

【0260】

分泌

本発明のヒトSEPは、由来細胞から、例えば、精巢中で天然に分泌される。しかしながら、ヒトSEPをエンコードしているポリヌクレオチド配列の突然変異、またはヒトSE

Pを発現する細胞中での翻訳後修飾の変更またはその不存在は、ヒトSE Pの非細胞外分泌（例えば、細胞内沈着）をもたらすことがありうる。このような場合、本発明のポリペプチドを一層容易に回収することができる培地中に、本発明のポリペプチドを発現宿主から分泌させることが望まれる。本発明により、分泌リーダー配列は、所望の発現宿主に基づいて選択されうる。ハイブリッドシグナル配列は、本発明の場合に用いることもできる。

【0261】

異種分泌リーダー配列の典型的な例は、真菌アミログルコシダーゼ（AG）遺伝子（gl a A—例えば、アスペルギルス属（*Aspergillus*）からの18アミノ酸および24アミノ酸両方の型）、 α -因子遺伝子（酵母、例えば、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）およびクルイベロミセス属（*Kluyveromyces*））または α -アミラーゼ遺伝子（バチルス属（*Bacillus*））に由来するものである。

【0262】

構築物

“コンジュゲート”、“カセット”および“ハイブリッド”などの用語と同意語である“構築物”という用語には、プロモーターに直接的にまたは間接的に結合した本発明によるヌクレオチド配列が含まれる。間接的結合の例は、本発明のプロモーターおよびヌクレオチド配列の中間の、Sh1-イントロンまたはADHイントロンなどのイントロン配列のような適当なスペーサー基の供給である。直接的または間接的結合が含まれる本発明に関する“融合した”という用語について同じことが当てはまる。各々の場合、それら用語は、野生型遺伝子プロモーターに通常は関連しているタンパク質をコードするヌクレオチド配列の自然の組合せであって、それらが両方ともそれらの自然環境中にある場合を包含しない。

【0263】

この構築物は、それが転移されている、例えば、細菌、好ましくは枯草菌（*Bacillus subtilis*）のような *Bacillus* 属の細菌、または植物中での遺伝子構築物の選択を考慮するマーカーを含有するまたは発現することもできる。種々のマーカーが存在するが、例えば、マンノース-6-リン酸イソメラーゼをエンコードするもの（特に、植物について）または抗生物質耐性、例えば、G418、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、カナマイシンおよびゲンタマイシンへの耐性を与えるマーカーなどを用いることができる。

【0264】

好ましくは、本発明の構築物は、少なくとも、プロモーターに機能可能に連結した本発明のヌクレオチド配列を含む。

ベクター

“ベクター”という用語には、発現ベクターおよび形質転換ベクターおよびシャトルベクターが含まれる。

【0265】

“発現ベクター”という用語は、*in vivo* または *in vitro* 発現の可能な構築物を意味する。

“形質転換ベクター”という用語は、一つの物質を別の物質に転移させることができる構築物を意味し、これは、同じ種のものであってよいしまたは異なった種のものであってよい。その構築物が、大腸菌（*E. coli*）プラスミドから *Bacillus* 属のような細菌へのように、一つの種から別の種に転移させることができる場合、この形質転換ベクターは、時々、“シャトルベクター”と称される。それは、*E. coli* プラスミドからアグロバクテリア菌（*Agrobacterium*）へ、植物へと転移させることができる構築物でもありうる。

【0266】

本発明のベクターは、下記のような適当な宿主細胞中に形質転換されて、本発明のポリペプチドを発現させることができる。したがって、もう一つの側面において、本発明は、本

10

20

30

40

50

発明によるポリペプチドを製造する方法であって、上記のような発現ベクターで形質転換されたまたはトランスフェクションされた宿主細胞を、それらポリペプチドをエンコードしているコーディング配列のベクターによって発現させる条件下で培養し、そして発現したポリペプチドを回収することを含む方法を提供する。

【0267】

これらベクターは、例えば、複製開始点、場合により、ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーターおよび場合により、そのプロモーターの調節因子を備えた、例えば、プラスミド、ウイルスまたはバクテリオファージ（ファージ）のベクターであってよい。

【0268】

本発明のベクターは、一つまたはそれを越える選択可能マーカー遺伝子を含有してよい。工業用微生物に最も適当な選択システムは、宿主生物中での突然変異を必要としない選択マーカーの群によって形成されるものである。真菌選択マーカーの例は、アセトアミダーゼ（amdS）、ATPシンターゼ、サブユニット9（oliC）、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ（pvrA）、フレオマイシンおよびベノミル耐性（benA）の遺伝子である。非真菌選択マーカーの例は、細菌G418耐性遺伝子（これは、酵母で用いることもできるが、糸状菌では用いることができない）、アンピシリン耐性遺伝子（E. coli）、ネオマイシン耐性遺伝子（Bacillus）およびβ-グルクロニダーゼ（GUS）をコードしているE. coli uidA遺伝子である。

【0269】

ベクターは、in vitro で、例えば、RNAの製造に用いることができるし、または宿主細胞をトランスフェクションするのにまたは形質転換するのに用いることができる。

【0270】

したがって、本発明のポリヌクレオチドは、組換えベクター（典型的には、複製可能ベクター）、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター中に包含されることができる。このベクターは、適合しうる宿主細胞中で核酸を複製するのに用いることができる。したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを製造する方法であって、本発明のポリヌクレオチドを複製可能ベクター中に導入し、そのベクターを適合しうる宿主細胞中に導入し、そしてその宿主細胞を、そのベクターの複製をもたらす条件下で成長させることによる方法を提供する。このベクターは、宿主細胞から回収することができる。適当な宿主細胞は、発現ベクターに関連して下に記載される。

【0271】

本発明は、更に、ヒトSEPのモジュレーター（例えば、阻害剤）の識別のためのスクリーニング法における、ヒトSEPまたはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体を発現する遺伝子操作された宿主細胞の使用に関する。このような遺伝子操作された宿主細胞は、ヒトSEP活性をモジュレートすることができるペプチドライブラリーまたは有機分子をスクリーニングするのに用いられうる。抗体、ペプチドまたは有機低分子のようなヒトSEPの阻害剤は、例えば、ヒトSEPに関連した疾患の予防および／または処置用の医薬組成物についての基準を提供するであろう。このような阻害剤は、このような疾患の予防および／または処置のために単独でまたは他の治療薬と組み合わせて投与することができる。

【0272】

本発明は、更に、ヒトSEPタンパク質の in vivo または in vitro 生産のための、またはヒトSEP発現または活性に影響を与えうる試剤についてスクリーニングするための、ヒトSEPまたはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体をエンコードしているポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターおよび宿主細胞に関する。

【0273】

組織

本明細書中で用いられる“組織”という用語には、組織それ自体および器官が含まれる。

【0274】

10

20

30

40

50

宿主細胞

本発明に関して、“宿主細胞”という用語には、本発明の組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことがありうるいずれかの細胞および／またはそれより得られる生成物が含まれるが、ここにおいて、プロモーターは、その宿主細胞中に存在する場合、本発明によるヌクレオチド配列の発現を可能にすることがありうる。

【0275】

したがって、本発明のさらなる態様は、本発明のポリヌクレオチドで形質転換されたまたはトランスフェクションされた宿主細胞を提供する。好ましくは、このポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドの複製および発現のためにベクター中で運ばれる。それら細胞は、このベクターと適合しうるように選択されるであろうが、例えば、原核性（例えば、細菌細胞）または真核性（すなわち、哺乳動物、真菌、昆虫、原生動物、酵母または植物の細胞）であってよい。

10

【0276】

グラム陰性細菌 *E. coli* は、異種遺伝子発現のための宿主として広く用いられている。しかしながら、多量の異種タンパク質は、細胞内部に蓄積しがちである。その後の *E. coli* 細胞内タンパク質のバルクからの所望のタンパク質の精製は、時々難しいことがありうる。

【0277】

E. coli とは対照的に、*Bacillus* 属からの細菌は、培地中にタンパク質を分泌するそれらの能力のために、異種宿主として極めて適している。宿主として適した他の細菌は、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) およびシュードモナス属 (*Pseudomonas*) からのものである。

20

【0278】

宿主細胞中へのポリヌクレオチドの導入は、Sambrook, et al., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA に記載の方法によって行うことができる。これらの方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスベクション (transfection)、マイクロインジェクション、形質導入、スクレイプローディング (scrape loading) および射出導入 (ballistic introduction) が含まれるが、これらに制限されるわけではない。

30

【0279】

代表的な宿主の例には、細菌細胞（例えば、*E. coli*、*Streptomyces*）；酵母細胞および *Aspergillus* のような真菌細胞；ショウジョウバエ属 (*Drosophila*) S2 およびスポドプテラ (*Spodoptera*) SF9 細胞のような昆虫細胞；CHO、COS、HEK、HeLa および 3T3 細胞のような動物細胞が含まれる。適当な宿主の選択は、当業者がなすことの範囲内であると考えられる。

【0280】

本発明のポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチドの性状、および／または発現されるタンパク質のさらなるプロセッシングへの所望に依存して、酵母または他の真菌のような真核生物宿主が好適でありうる。概して、酵母細胞は、操作するのが一層容易であるので、真菌細胞より好適である。しかしながら、いくつかのタンパク質は、酵母細胞から不十分にしか発現されないかまたは分泌されないし、またはある場合には、適切に処理されない（例えば、酵母中での高グリコシル化）。これらの状況では、別の真菌宿主生物が選択されるべきである。

40

【0281】

本発明の範囲内の適当な発現宿主の例は、*Aspergillus* 種 (EP-A-0184438 号および EP-A-0284603 号に記載のものなど) およびトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 種のような真菌；エシェリキア属 (*Escherichia*

50

a) 種または *Bacillus* 種 (EP-A-0134048号およびEP-A-0253455号に記載のものなど)、*Streptomyces* 種および *Pseudomonas* 種のような細菌; *Kluyveromyces* 種 (EP-A-0096430号およびEP-A-0301670号に記載のものなど) および *Saccharomyces* 種のような酵母である。例として、典型的な発現宿主は、クロカビ (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニガー変異ツビジェニス (*Aspergillus niger* var. *tubigenis*)、アスペルギルス・ニガー変異アワモリ (*Aspergillus niger* var. *awamori*)、アスペルギルス・アクレアティス (*Aspergillus aculeatis*)、アスペルギルス・ニドゥランス (*Aspergillus nidulans*)、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・レエセイ (*Trichoderma reesei*)、クルイベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、パチルス・リシェニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、パチルス・アミノリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) およびパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) より選択されてよい。

10

【0282】

哺乳動物、酵母、昆虫、植物および真菌の宿主細胞などの適当な宿主細胞の使用は、本発明の組換え発現生成物に最適の生物学的活性を与えるのに必要とされることがありうる翻訳後修飾 (例えば、ミリスチル化、グリコシル化、先端切断 (*truncation*)、ラビデーション (*lapidation*)、およびチロシン、セリンまたはトレオニンリン酸化) に備えることができる。

20

【0283】

生物

本発明に関する“生物”という用語には、本発明による組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列および／またはそれより得られる生成物を含むことがありうる、ヒトを除くいずれかの生物が含まれるが、ここにおいて、プロモーターは、その生物中に存在する場合、本発明によるヌクレオチド配列の発現を可能にすることがありうる。生物の例には、真菌、酵母、植物または原生動物が含まれてよい。

30

【0284】

本発明に関する“トランスジェニック生物”という用語には、本発明によるタンパク質をコードするヌクレオチド配列および／またはそれより得られる生成物を含む、ヒトを除くいずれかの生物が含まれるが、ここにおいて、プロモーターは、その生物中での本発明によるヌクレオチド配列の発現を可能にすることがありうる。好ましくは、このヌクレオチド配列は、その生物のゲノム中に包含される。

【0285】

“トランスジェニック生物”という用語は、その自然環境中にもある天然のプロモーターの制御下にある場合のその自然環境中にある本発明による天然のヌクレオチドコーディング配列を包含しない。更に、本発明は、それがその自然環境中にある場合、およびそれが、その自然環境中にもあるその天然のヌクレオチドコーディング配列によって発現されている場合、およびそのヌクレオチド配列が、その自然環境中にもあるその天然のプロモーターの制御下にある場合、本発明による天然のタンパク質を包含しない。

40

【0286】

したがって、本発明のトランスジェニック生物には、本発明によるアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列のいずれか一つまたは組合せ、本発明による構築物 (それらの組合せを含めた)、本発明によるベクター、本発明によるプラスミド、本発明による細胞および本発明による組織またはそれらの生成物、を含む生物が含まれる。形質転換された細胞または生物は、その細胞または生物から容易に回収できると考えられる所望の化合物

50

の許容しうる量を製造しうると考えられる。

【0287】

宿主細胞／宿主生物の形質転換

先に示したように、宿主生物は、原核生物または真核生物でありうる。適当な原核生物宿主の例には、*E. coli* および *Bacillus subtilis* が含まれる。原核生物宿主の形質転換についての教示は、当該技術分野においてよく文書化されており、例えば、Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA) および Ausubel, et al. (*Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley & Sons, Inc.) を参照されたい。 10

【0288】

一つの態様において、形質転換された宿主は、哺乳動物細胞、または例えば、昆虫細胞であり、ここにおいて、これら宿主細胞中へのポリヌクレオチドの導入は、例えば、Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA) に記載の方法によって行うことができる。これら方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスベクション、マイクロインジェクション、形質導入、スクレイプローディングおよび射出導入が含まれるが、これらに制限されるわけではない。 20

【0289】

もう一つの態様において、トランスジェニック生物は酵母でありうる。この点で、酵母は、異種遺伝子発現のためのビヒクルとしても広く用いられてきている。*Saccharomyces cerevisiae* 種には、異種遺伝子発現のための使用を含めた長い工業使用の歴史がある。*Saccharomyces cerevisiae* における異種遺伝子の発現は、Goodey et al. (1987, *Yeast Biotechnology*, D R Berry et al, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) によっておよび King et al. (1989, *Molecular and Cell Biology of Yeasts*, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow) によって概説されている。 30

【0290】

いくつかの理由で、*Saccharomyces cerevisiae* は、異種遺伝子発現によく適している。第一に、それはヒトに非病原性であり、しかも、一定の内毒素を生産することができない。第二に、それには、何百年にも渡るいろいろな目的の商業的利用に続く安全使用の長い歴史がある。これが、広い社会的受容性をもたらしている。第三に、この生物に専念した広範囲にわたる商業的使用および研究は、遺伝学および生理学並びに *Saccharomyces cerevisiae* に特有の大規模発酵についての豊富な情報をもたらしている。 40

【0291】

Saccharomyces cerevisiae における異種遺伝子発現および遺伝子産物の分泌の原理についての概説は、E Hinchcliffe and E Kenny ("Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", 1993, *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.) によって与えられている。

【0292】

それらの維持のために宿主ゲノムでの組換えを必要とする組込みベクター、および自律複製プラスミドベクターを含めたいくつかのタイプの酵母ベクターが利用可能である。

【0293】

トランスジェニック *Saccharomyces* を製造するために、本発明のヌクレオチド配列を、酵母での発現用に設計された構築物中に挿入することによって発現構築物を製造する。異種発現に用いられるいくつかのタイプの構築物が開発されている。これら構築物は、本発明のヌクレオチド配列に融合した酵母中で活性なプロモーターを含有するが、通常は、GAL1プロモーターのような酵母起源のプロモーターを用いる。通常は、SUC2シグナルペプチドをエンコードしている配列のような酵母起源のシグナル配列を用いる。酵母中で活性なターミネーターが、この発現系の末端となっている。

10

【0294】

酵母の形質転換のために、いくつかの形質転換プロトコルが開発されている。例えば、本発明によるトランスジェニック *Saccharomyces* は、Hinnen et al. (1978, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 75:1929); Beggs, J D (1978, *Nature, London*, 275:104); および Ito, H et al. (1983, *J. Bacteriology* 153:163-168) の教示にしたがうことによって製造することができる。

20

【0295】

形質転換された酵母細胞は、いろいろな選択マーカーを用いて選択される。形質転換に用いられるマーカーの中には、LEU2、HIS4およびTRP1のような多数の栄養要求性マーカー、およびアミノグリコシド抗生物質マーカー、例えば、G418のような支配的な抗生物質耐性マーカーがある。

【0296】

もう一つの宿主生物は植物である。遺伝子修飾された植物の構築における基本原理は、挿入された遺伝物質の安定な維持が得られるように、植物ゲノム中に遺伝情報を挿入することである。

【0297】

遺伝情報を挿入するためのいくつかの技術があるが、その二つの主な原理は、遺伝情報の直接的導入およびベクター系の使用による遺伝情報の導入である。一般的な技術の概説は、Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) および Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, March/April 1994, 17-27) による論文に見出されうる。植物の形質転換についての更に別の技術は、EPA-0449375号に見出されうる。

30

【0298】

したがって、本発明は、更に、配列番号：1または配列番号：5に示されるヌクレオチド配列またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメントで宿主細胞を形質転換する方法を提供する。

40

【0299】

ヒトSEPヌクレオチドコーディング配列で形質転換された宿主細胞は、そのエンコードされたタンパク質の細胞培養物からの発現および回収に適した条件下で培養することができる。組換え細胞によって生産されるタンパク質は、用いられる配列および／またはベクターに依存して、分泌されてよいしまたは細胞内に含有されていてよい。当業者によって理解されるように、ヒトSEPコーディング配列を含有する発現ベクターは、特定の原核生物または真核生物の細胞膜によってヒトSEPコーディング配列の分泌を支配するシグナル配列で設計されることができる（ヒトSEPがこのようなシグナル配列の不存在下で分泌されない場合）。他の組換え構築物は、可溶性タンパク質の精製を容易にするであろうポリペプチドドメインをエンコードしているヌクレオチド配列に、ヒトSEPコーディ

50

ング配列をつなぐことができる (K r o l l D J e t a l . (1 9 9 3) D N A C e l l B i o l . , V o l 1 2 , p p . 4 4 1 - 5 3 ; 融合タンパク質を含有するベクターについての上記の考察も参照されたい)。

【0300】

遺伝子操作されるまたは遺伝子修飾される

“ 遺伝子修飾され ” ている細胞、好ましくは、動物細胞は、遺伝子操作することによってその細胞中にまたは前駆細胞中に導入される修飾についてヘテロ接合性またはホモ接合性である。修飾を導入するのに利用可能である標準的な遺伝子操作法には、相同的組換え、ウイルスベクター遺伝子トラップ法、照射、化学的突然変異誘発、およびアンチセンス R N A をエンコードしているヌクレオチド配列の単独でのまたは触媒リボザイムとの組合せでのトランスジェニック発現が含まれる。遺伝子修飾に好ましい方法は、相同的組換えおよびウイルスベクター遺伝子トラップ法であり、これらは両方とも、内因性遺伝子を、その遺伝子座中に外来の核酸配列を挿入することによって修飾する。その遺伝子にとって外来の核酸配列は、その遺伝子中に天然に存在しない外因性配列である。この外来の D N A の挿入は、ヒト S E P 遺伝子のいずれの領域中でも、例えば、エンハンサー、プロモーター、調節領域、非コーディング領域、コーディング領域、イントロンまたはエクソンで起こりうる。最も好ましい遺伝子操作法は、相同的組換えであるが、ここにおいて、外来の核酸配列は、標的方式において、単独でかまたは内因性遺伝子配列の一部分の欠失と組合せて挿入される。

10

20

【0301】

機能的に破壊される

“ 機能的に破壊され ” ているヒト S E P 遺伝子とは、破壊された遺伝子によってエンコードされるヒト S E P ポリペプチドの細胞活性が、ヒト S E P 遺伝子の野生型を通常発現する細胞中で減少するように遺伝子修飾されているヒト S E P 遺伝子を意味する。遺伝子修飾が、細胞中のヒト S E P 遺伝子の全ての野生型コピーを全て有効に除去する場合 (例えば、好ましくは動物細胞である遺伝子修飾された細胞は、ヒト S E P 遺伝子破壊についてホモ接合性である、または最初に存在するヒト S E P 遺伝子の野生型コピーだけがここで破壊される)、この遺伝子修飾は、野生型ヒト S E P 遺伝子を発現する適当な対照細胞と比較して、ヒト S E P ポリペプチド活性を減少させる。ヒト S E P ポリペプチド活性のこの減少は、減少したヒト S E P 遺伝子発現によって生じる (すなわち、ヒト S E P m R N A レベルは、有効に減少し、減少したレベルのヒト S E P ポリペプチドを生じる) か、および/または破壊されたヒト S E P 遺伝子が、野生型ヒト S E P ポリペプチドと比較して低下した機能または安定性を有する突然変異ポリペプチドをエンコードしているためである。好ましくは、遺伝子修飾された細胞中のヒト S E P ポリペプチドの活性は、野生型レベルの 5 0 % またはそれ未満まで、より好ましくは、2 5 % またはそれ未満まで、そしてなお一層好ましくは、野生型レベルの 1 0 % またはそれ未満まで減少する。最も好ましくは、ヒト S E P 遺伝子破壊は、ヌル突然変異を引き起こす。

30

【0302】

遺伝子修飾された動物細胞

機能的に破壊されたヒト S E P 遺伝子を含有する “ 遺伝子修飾された動物細胞 ” とは、機能的に破壊されたヒト S E P 遺伝子を含有するように遺伝子操作することによって生じるヒト細胞を含めた動物細胞、並びに破壊されたヒト S E P 遺伝子を遺伝する娘細胞を意味する。これら細胞は、当該技術分野において知られているいずれの標準法によっても、培養物中で遺伝子修飾することができる。培養物中で細胞を遺伝子修飾することに代わるものとして、非ヒト哺乳動物細胞は、ヒト S E P 遺伝子破壊を含有する遺伝子修飾された非ヒト哺乳動物から単離されてもよい。本発明の動物細胞は、一次細胞または組織標品、並びに培養に適応した、腫瘍発生性のまたは形質転換された細胞系から得ることができる。これら細胞および細胞系は、例えば、内皮細胞、上皮細胞、島細胞、ニューロンおよび他の神経組織由来細胞、中皮細胞、骨細胞、リンパ球、軟骨細胞、造血細胞、免疫細胞、主要な腺または器官 (例えば、肝、肺、心臓、胃、脾臓、腎臓および皮膚) の細胞、筋細胞

40

50

(骨格筋、平滑筋および心筋からの細胞を含めた)、外分泌または内分泌細胞、線維芽細胞、および胚性および他の全能性または多能性幹細胞(例えば、胚性幹(ES)細胞、ES様細胞、および胚性生殖系列(EG)細胞、および前駆細胞および組織由来幹細胞のような他の幹細胞)に由来する。好ましい遺伝子修飾された細胞は、ES細胞、より好ましくは、マウスまたはラットES細胞、そして最も好ましくは、ヒトES細胞である。

【0303】

ヒトSEP遺伝子での相同的組換えのためのターゲッティングベクター中で用いられる“相同領域”は、ヒトSEP遺伝子の一部分に、または当該技術分野において(例えば、*Current Protocols in Human Genetics, unit 4.1, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000*に記載のように)知られている標準的な低ストリンジェンシー条件下において相同領域とヒトSEP遺伝子配列との間にハイブリダイゼーションを生じさせるのに十分な程度までヒトSEP遺伝子に隣接している配列に関係がある(すなわち、相補的である)。

【0304】

“ES細胞”または“ES様細胞”とは、不定の自己再生並びに3種類全部の胚葉を代表するものである細胞タイプへの分化が可能である胚、始原生殖細胞、または奇形癌に由来する多能性幹細胞を意味する。

【0305】

“減少する”とは、統計的に有意の減少(すなわち、 $p < 0.1$)を意味する。本発明のヒト細胞を含めた遺伝子修飾された動物細胞は、ヒトSEP遺伝子を機能的に破壊する修飾についてヘテロ接合性またはホモ接合性である。これら動物細胞は、培養物中で細胞を遺伝子操作することによって得られてよいし、または非ヒト哺乳動物細胞の場合、遺伝子修飾された非ヒト哺乳動物から細胞を単離してよい。

【0306】

ヒトSEP遺伝子座は、化学的突然変異誘発(Rinchik, *Trends in Genetics* 7:15-21, 1991, Russell, *Environmental & Molecular Mutagenesis* 23 (Suppl. 24) 23-29, 1994)、照射(Russell, 上記)、単独でかまたは触媒RNAリボザイム配列との組合せでのヒトSEP遺伝子アンチセンスRNAのトランスジェニック発現(Luyckx et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:12174-79, 1999; Sokol et al., *Transgenic Research* 5:363-71, 1996; Efrat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2051-55, 1994; Larsson et al., *Nucleic Acids Research* 22:2242-48, 1994)、および下に更に考察される、ヒトSEP遺伝子座中への外来の核酸配列の挿入によるヒトSEP遺伝子の破壊を含めた、当該技術分野において知られているいくつかの遺伝子修飾技術の一つによって機能的に破壊される。好ましくは、この外来の配列は、相同的組換えによってまたはウイルスベクターの挿入によって挿入される。最も好ましくは、ヒトSEP遺伝子破壊の方法は、相同的組換えであり、これには、内因性ヒトSEP遺伝子配列の一部分の欠失が含まれる。

【0307】

外来の配列の組込みは、次の機作の一つまたはそれを越えるものによって、すなわち：ヒトSEP遺伝子の転写または翻訳過程を妨げることによって(例えば、プロモーター認識を妨げることによって、または転写終結部位または翻訳停止コドンヒトSEP遺伝子中に導入することによって)；またはヒトSEP遺伝子コーディング配列を、それがもはや、通常の酵素機能を有するヒトSEPポリペプチドをエンコードしないように変形させることによって(例えば、外来のコーディング配列をヒトSEP遺伝子コーディング配列中に挿入することによって、フレームシフト突然変異または一つまたは複数のアミノ酸置換を導入することによって、または二重乗換えイベントの場合、機能的酵素の発現に必要とされるヒトSEP遺伝子コーディング配列の一部分を欠失することによって)；ヒトSEP

P 遺伝子を機能的に破壊する。

【0308】

細胞のゲノム中のヒトSEP遺伝子座中に外来の配列を挿入するためには、この外来のDNA配列を、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、レトロウイルス感染、マイクロインジェクション、ビオリスティクス (biolistics)、リポソームトランスフェクション、DEAE-デキストラントランスフェクションまたはトランスフェリンフェクションのような当該技術分野において知られている標準法によって細胞中に導入する (例えば、Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982; Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:7161-65, 1984; Chu et al., Nucleic Acids Res. 15:1311-26, 1987; Thomas and Capecci, Cell 51:503-12, 1987; Baum et al., Biotechniques 17:1058-62, 1994; Biewenga et al., J. Neuroscience Methods 71:67-75, 1997; Zhang et al., Biotechniques 15:868-72, 1993; Ray and Gage, Biotechniques 13:598-603, 1992; Lo, Mol. Cell. Biol. 3:1803-14, 1983; Nickoloff et al., Mol. Biotech. 10:93-101, 1998; Linney et al., Dev. Biol. (Orlando) 213:207-16, 1999; Zimmer and Gruss, Nature 338:150-153, 1989; および Robertson et al., Nature 323:445-48, 1986 を参照されたい)。外来のDNAを細胞中に導入する好ましい方法は、エレクトロポレーションである。

【0309】

相同的組換え

相同的組換えの方法は、ヒトSEP遺伝子を含有する細胞中にヒトSEP遺伝子ターゲッティングベクターを導入することにより、ヒトSEP遺伝子を破壊の標的とする。ヒトSEP遺伝子を破壊の標的とするこのベクターの能力は、ヒトSEP遺伝子に相同であるベクター中のヌクレオチド配列を用いることによって生じる。この相同領域は、このベクターとヒトSEP遺伝子の内因性配列との間のハイブリダイゼーションを容易にする。ハイブリダイゼーションにより、このターゲッティングベクターとゲノム配列との間の乗換えイベントの確率が大きく増加する。この乗換えイベントは、ヒトSEP遺伝子座中へのベクター配列の組込みおよびヒトSEP遺伝子の機能的破壊を引き起こす。

【0310】

ターゲッティングに用いられるベクターの構築に関する一般的な原理は、Bradley et al. (Biotechnol. 10:534, 1992) に概説されている。二つの異なった典型的なタイプのベクター、すなわち、挿入ベクターまたは置換ベクターを用いて、相同的組換えによってDNAを挿入することができる。挿入ベクターとは、二本鎖切断部 (break) を含むヒトSEP遺伝子相同性領域を含有する環状DNAである。この相同性領域と内因性ヒトSEP遺伝子との間のハイブリダイゼーション後、二本鎖切断部における単一乗換えイベントは、この乗換え部位の内因性遺伝子中へのベクター配列全体の挿入をもたらす。

【0311】

相同的組換えに用いるより好ましいベクターは、置換ベクターであるが、これは、環状よりむしろ共直線性である。ヒトSEP遺伝子中への置換ベクター組込みは、二重乗換えイベント、すなわち、ターゲッティングベクターとヒトSEP遺伝子との間の二つのハイブリダイゼーション部位における乗換えを必要とする。この二重乗換えイベントは、二つの乗換え部位の間に挟まれているベクター配列のヒトSEP遺伝子中への組込み、および本来二つの乗換え部位の間に広がる該当する内因性ヒトSEP遺伝子配列の欠失をもたらす (例えば、Thomas and Capecci et al., Cell 51:50

3-12, 1987; Mansour et al., Nature 336:348-52, 1988; Mansour et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7688-7692, 1990; および Mansour, GATA 7:219-227, 1990 を参照されたい)。

【0312】

ターゲッティングベクター中の相同性領域は、概して、少なくとも100ヌクレオチドの長さである。最も好ましくは、この相同性領域は、少なくとも1～5キロベース (Kb) の長さである。相同性領域に必要な最低限の長さまたは最低限の関係性度は示されていないが、相同的組換えのためのターゲッティング効率は、概して、ターゲッティングベクターとヒトSEP遺伝子座との間の長さおよび関係性度と対応する。置換ベクターが用いられ、そして内因性ヒトSEP遺伝子の一部分が相同的組換えで欠失している場合、更に考慮されるべきことは、内因性ヒトSEP遺伝子の欠失部分のサイズである。内因性ヒトSEP遺伝子のこの部分が1Kbの長さを越える場合、1Kbより長い相同性領域を含むターゲッティングカセットは、組換えの効率を増進させるために推奨される。相同的組換えに有効な配列の選択および使用に関する更に別の指針は、参考文献に記載されている (例えば、Deng and Capecchi, Mol. Cell. Biol. 12:3365-3371, 1992; Bollag et al., Annu. Rev. Genet. 23:199-225, 1989; および Waldman and Liskay, Mol. Cell. Biol. 8:5350-5357, 1988 を参照されたい)。

10

20

【0313】

ヒトSEP遺伝子ターゲッティングベクターの構築では、ベクター主鎖として、pBluescript 関連プラスミド (例えば、Bluescript KS+11)、pQE70、pQE60、pQE-9、pBS、pD10、ファージスクリプト、phiX174、pBK ファージミド、pNH8A、pNH16a、pNH18Z、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、およびpRIT5 PWLNEO、pSV2CAT、pXT1、pSG (Stratagene)、pSVK3、PBPV、PMSG、およびpSVL、pBR322およびpBR322に基づくベクター、pBM9、pBR325、pKH47、pBR328、pHC79、ファージ Charon 28、pKB11、pKSV-10、pK19 関連プラスミド、pUC プラスミド、およびpGEM系列プラスミドを含めたいろいろなクローニングベクターを用いることができる。これらベクターは、種々の市販元から入手可能である (例えば、Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; Qiagen, Valencia, CA; Stratagene, La Jolla, CA; Promega, Madison, WI; および New England Biolabs, Beverly, MA: 全て米国)。しかしながら、いずれの他のベクター、例えば、プラスミド、ウイルスまたはその一部分も、それらが複製可能であり且つ所望の宿主中で生存可能である限り用いることができる。ベクターは、ゲノムが修飾される宿主中でそれを複製することができるようにする配列も含んでいてよい。このようなベクターの使用は、組換えが起こりうる相互作用期間を拡大して、ターゲッティングの効率を増加させることができる (Molecular Biology, ed. Ausubel et al, Unit 9.16, Fig. 9.16.1 を参照されたい)。

30

40

【0314】

上記のターゲッティングベクターを増殖させるのに用いられる具体的な宿主は、重要ではない。例には、E. coli K12RR1 (Bolivar et al., Gene 2:95, 1977)、E. coli K12HB101 (ATCC 番号 33694)、E. coli MM21 (ATCC 番号 336780)、E. coli DH1 (ATCC 番号 33849)、E. coli 菌株DH5αおよびE. coli STBL2が含まれる。或いは、C. cerevisiae のような宿主を用いることができる。上述の宿

50

主は、市販されている（例えば、Stratagene, La Jolla, CA, USA; および Life Technologies, Rockville, MD, USA）。

【0315】

ターゲッティングベクターを生じるためには、ヒトSEP遺伝子ターゲッティング構築物を上記のベクター主鎖に加える。上記のヒトSEP遺伝子ターゲッティング構築物は、少なくとも一つのヒトSEP遺伝子相同性領域を有する。このヒトSEP遺伝子相同性領域を作るためには、ヒトSEP遺伝子に関係した配列を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーを製造するための基準として用いる。これらプライマーは、ヒトSEP配列の所望の領域を極めて正確なPCR増幅によって増幅させるために用いる（Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:4967, 1991; Eckert and Kunkel 1:17, 1991; および米国特許第4,683,202号）。ゲノム配列は、ゲノムクローンライブラリーからまたはゲノムDNAの製造から、好ましくは、ヒトSEP遺伝子破壊についてターゲッティングが行われる動物種から得られる。

【0316】

好ましくは、上記のターゲッティング構築物には、正のマーカータンパク質をエンコードしている外因性ヌクレオチド配列も含まれる。ベクター組込み後の正のマーカーの安定な発現は、細胞生存率に影響することなく、識別可能な特性を細胞に与える。したがって、置換ベクターの場合、マーカー遺伝子は、二重乗換えイベント後にそれがヒトSEP遺伝子中に組み込まれるように、二つの隣接している相同性領域の間に位置する。

【0317】

正のマーカータンパク質は選択可能タンパク質であるのが好適であり、このようなタンパク質の細胞中での安定な発現は、選択可能な表現型特性を与える、すなわち、この特性は、それがなければ致死する条件下における細胞の生存を増進させる。したがって、選択可能な条件を課すことにより、ベクター配列を生存率に基づいて首尾よく組み込んでいない他の細胞から、正の選択可能マーカーを安定して発現する細胞を単離することができる。正の選択可能マーカータンパク質（およびそれらの選択試剤）の例には、Neo（G418またはカノマイシン）、Hyg（ハイグロマイシン）、HisD（ヒスチジノール）、Gpt（キサンチン）、Ble（ブレオマイシン）およびHprt（ヒポキサンチン）が含まれる（例えば、Capecchi and Thomas, 米国特許第5,464,764号およびCapecchi, Science 244:1288-92, 1989を参照されたい）。選択可能マーカーに代わるものとして用いることもできる他の正のマーカーには、 β -ガラクトシダーゼのようなレポータータンパク質、ホタルルシフェラーゼまたはグリーン蛍光タンパク質が含まれる（例えば、Current Protocols in Cytometry, Unit 9.5 および Current Protocols in Molecular Biology, Unit 9.6, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000を参照されたい）。

【0318】

上記の正の選択スキームは、いずれかの染色体位置へのベクター配列のランダムな非相同的組込みに対して、ヒトSEP遺伝子座に標的相同的組換えによってベクターが組み込まれた細胞間を区別することはない。したがって、相同的組換えに置換ベクターを用いる場合、負の選択可能マーカータンパク質をエンコードしているヌクレオチド配列を含むことも好適である。負の選択可能マーカーの発現は、ある種の試剤にさらされた場合、そのマーカーを発現する細胞の生存率を減少させる（すなわち、そのマーカータンパク質は、特定の選択可能な条件下において細胞にとって致命的になる）。負の選択可能マーカー（およびそれらの致死性試剤）の例には、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ガンシクロビルまたは1,2-デオキシ-2-フルオロ- α -D-アラビノフラノシル-5-ヨードウラシル）、Hprt（6-チオグアニンまたは6-チオキサンチン）、およびジフテリア毒素、リシン毒素およびシトシンデアミナーゼ（5-フルオロシトシン）が含まれる

。

【0319】

負の選択可能マーカーをエンコードしているヌクレオチド配列は、置換ベクターの二つの相同性領域の外側に位置する。この位置にあると、細胞は、ランダムな非相同的組換えによって組込みが生じる場合にのみ、負の選択可能マーカーを単に組込み且つ安定して発現するであろうが、ヒトSEP遺伝子とターゲッティング構築物中の二つの相同性領域との間の相同的組換えは、負の選択可能マーカーをエンコードしている配列を組込みから除外する。したがって、負の条件を課すことにより、ランダムな非相同的組換えによってターゲッティングベクターが組み込まれた細胞は生存率が減少する。

【0320】

正および負の選択可能マーカーの上記組合せは、一連の正および負の選択工程を、相同的組換えによってベクター組込みが行われ、したがって、潜在的に破壊されたヒトSEP遺伝子を有する細胞だけをより効率よく選択するように設計することができるので、好適である。正・負選択スキーム、選択可能マーカーおよびターゲッティング構築物の更に別の例は、例えば、米国特許第号5,464,764、WO94/06908号および Valancius and Smithies, Mol. Cell. Biol. 11:1402, 1991 に記載されている。

【0321】

ベクター組込みによってマーカータンパク質が安定して発現されるために、マーカーコーディング配列がベクター組込みによって内因性ヒトSEP遺伝子プロモーターに機能的に連結するように、ターゲッティングベクターを設計することができる。次に、そのマーカーの発現を、通常はヒトSEP遺伝子を発現する細胞中においてヒトSEP遺伝子プロモーターによって作動させる。或いは、そのベクターのターゲッティング構築物中の各々のマーカーは、ヒトSEP遺伝子プロモーターとは無関係の発現を作動するそれ自体のプロモーターを含有してよい。この後者のスキームは、ヒトSEP遺伝子を典型的に発現しない細胞中においてマーカーの発現を可能にする利点を有する (Smith and Berg, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49:171, 1984; Sedivy and Sharp, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:227: 1989; Thomas and Capecchi, Cell 51:503, 1987)。

【0322】

マーカー遺伝子発現を作動するのに用いることができる外因性プロモーターには、細胞特異的または段階特異的プロモーター、構成性プロモーター、および誘導性または調節可能プロモーターが含まれる。これらプロモーターの制限されない例には、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター／エンハンサー、SV40プロモーター、PGKプロモーター、PMCl-neo、メタロチオネインプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、鳥類のトリβグロビンプロモーター、ヒストンプロモーター (例えば、マウスヒストンH3-614)、βアクチンプロモーター、ニューロン特異的エノラーゼ、筋アクチンプロモーター、およびカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターが含まれる (概して、Sambrook et al., Molecular Cloning, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, および Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000; Stratagene, La Jolla, CA, USA を参照されたい)。

【0323】

細胞が、ベクター配列を標的ヒトSEP遺伝子座中に組み込まれたかどうか確かめるためには、所望のベクター組込みイベントに特異的であるプライマーまたはゲノムプローブを、PCRまたはサザンブロット分析と組み合わせて用いて、ヒトSEP遺伝子座中への所

10

20

30

40

50

望のベクター組込みの存在を確認することができる (Erllich et al., Science 252:1643-51, 1991; Zimmer and Gruss, Nature 338:150, 1989; Mouellic et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:4712, 1990; および Shesely et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:4294, 1991)。

【0324】

遺伝子トラップ法

ヒトSEP遺伝子を機能的に破壊するために、外来の核酸配列をヒトSEP遺伝子座中に挿入するのに利用可能なもう一つの方法は、遺伝子トラップ法である。この方法は、エクソンをmRNA中にスプライシングして、遺伝子トラップベクターコーディング配列を遺伝子中にランダム様式で挿入する、全ての哺乳動物細胞に存在する細胞機構を利用する。いったん挿入されると、遺伝子トラップベクターは、トラップされたヒトSEP遺伝子を機能的に破壊しうる突然変異を生じる。相同的組換えとは対照的に、突然変異誘発のためのこのシステムは、極めてランダムな突然変異を生じる。したがって、機能的に破壊されたヒトSEP遺伝子を含む遺伝子修飾された細胞を得るためには、この特定の突然変異を含む細胞を、種々の遺伝子のランダム突然変異を含む細胞のプールから識別し且つ選択しなければならない。

【0325】

遺伝子トラップ用のシステムおよびベクターは、ネズミ細胞および他の細胞タイプを遺伝子修飾する場合の使用について記載されている (例えば、Allen et al., Nature 33:852-55, 1988; Bellen et al., Genes Dev. 3:1288-1300, 1989; Bier et al., Genes Dev. 3:1273-1287, 1989; Bonnerot et al., J. Virol. 66:4982-91, 1992; Brenner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5517-21, 1989; Chang et al., Virology 193:737-47, 1993; Friedrich and Soriano, Methods Enzymol. 225:681-701, 1993; Friedrich and Soriano, Genes Dev. 5:1513-23, 1991; Goff, Methods Enzymol. 152:469-81, 1987; Gossler et al., Science 244:463-65, 1989; Hope, Develop. 113:399-408, 1991; Kerr et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2:767-776, 1989; Reddy et al., J. Virol. 65:1507-1515, 1991; Reddy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:6721-25, 1992; Skarnes et al., Genes Dev. 6:903-918, 1992; von Melchner and Ruley, J. Virol. 63:3227-3233, 1989; および Yoshida et al., Transgen. Res. 4:277-87, 1995 を参照されたい)。

【0326】

プロモータートラップ (5'トラップ) ベクターは、5'~3'の順で、スプライスアクセプター配列の後にエクソンを含むが、これは、典型的に、翻訳開始コドンおよび読み取り枠 (ORF) および/または内部リボソームエントリー部位を特徴とする。概して、これらプロモータートラップベクターは、プロモーターも、機能的に連結したスプライスドナー配列も含まない。したがって、宿主細胞の細胞性ゲノム中への組込み後、そのプロモータートラップベクター配列は、上流の遺伝子の通常のスプライシングを遮断し、末端エクソンとして作用する。ベクターコーディング配列の発現は、適当な読み枠中の破壊された遺伝子のイントロン中へのベクター組込みに依存する。このような場合、細胞性スプライシング機構は、ベクターコーディング配列の上流のトラップされた遺伝子からエ

10

20

30

40

50

クソンをスプライシングする (Zambrowicz et al., WO99/50426号)。

【0327】

上記のプロモーターラップベクターと類似の作用を生じる別の方法は、プロモーターラップベクターのスプライスアクセプターと翻訳開始コドンまたはポリアデニル化配列との間の領域中に存在するまたはそれ以外の場合、その領域中に遺伝子操作される停止コドンの *nested* セットを包含するベクターである。コーディング配列は、独立リボソームエンタリー部位 (IRES) を含有するように遺伝子操作することもできるので、そのコーディング配列は、宿主細胞ゲノム中の組込み部位とはほとんど無関係に発現されるであろう。典型的には、必然的ではなく、IRESは、停止コドンの *nested* セットと連結して用いられる。

【0328】

別のタイプの遺伝子トラップスキームは、3' 遺伝子トラップベクターを用いる。このタイプのベクターは、操作上の組合せで、プロモーター領域を含有するが、これは、隣接するコーディング配列、そのコーディング配列、およびコーディング配列エクソンの3' 末端を規定するスプライスドナー配列の発現を媒介する。宿主細胞ゲノム中への組込み後、ベクタープロモーターによって発現される転写物は、組み込まれた遺伝子トラップベクター配列の下流に位置するトラップされた遺伝子からスプライスアクセプター配列へとスプライシングされる。したがって、ベクターの組込みは、3' 遺伝子トラップカセットのコーディング配列、および末端エクソンおよびそのポリアデニル化シグナルを含めたいずれかの下流細胞性エクソンを含む融合転写物の発現を引き起こす。このようなベクターが遺伝子中に組み込まれる場合、細胞性スプライシング機構は、トラップされた遺伝子の3' エクソンの上流のベクターコーディング配列をスプライシングする。このようなベクターの一つの利点は、3' 遺伝子トラップベクターの発現が、遺伝子トラップカセット中のプロモーターによって作動されるので、宿主細胞中で通常発現される遺伝子中への組込みを必要としないということである (Zambrowicz et al., WO99/50426号)。3' 遺伝子トラップベクター中に包含されてよい転写プロモーターおよびエンハンサーの例には、ターゲッティングベクターに関して上に論及されたものが含まれる。

【0329】

プロモーターまたは3' 遺伝子トラップベクターの構成成分として用いられるウイルスベクター主鎖は、標的細胞のゲノム中に挿入されうる広範囲のベクターより選択されてよい。適当な主鎖ベクターには、単純ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、仮性狂犬病ウイルス、 α -ヘルペスウイルスベクター等が含まれるが、これらに制限されるわけではない。ウイルスベクター、特に、非複製性細胞を修飾するのに適したウイルスベクター、および外因性ポリヌクレオチド配列の発現と連結したこのようなベクターの使用法についての詳細な概説は、*Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*, Eds. Caplitt and Loewy, Academic Press, San Diego, 1995

【0330】

おそらくは、遺伝子トラップ法にはレトロウイルスベクターが用いられる。これらベクターは、米国特許第5,449,614号に記載されたようなレトロウイルスパッケージング細胞系と連結して用いることができる。非ネズミ哺乳動物細胞を遺伝子修飾の標的細胞として用いる場合、両種性または汎親和性のパッケージング細胞系を用いて、適当なベクターをパッケージすることができる (Ory et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:11400-11406, 1996)。現在記載されている3' 遺伝子トラップベクターを生じるのに適応させうる代表的なレトロウイルスベクターは、例えば、米国特許第5,521,076号に記載されている。

【0331】

遺伝子トラップ用ベクターは、相同的組換えに用いられるターゲッティングベクターに関して上に論及された正のマーカー遺伝子の一つまたはそれを越えるものを含有してよい。ターゲッティングベクターでのそれらの使用と同様に、これら正のマーカーは、遺伝子トラップ用ベクター中において、細胞ゲノム中にベクターを組み込まれた細胞を識別し且つ選択するのに用いられる。このマーカー遺伝子は、独立リボソームエントリー部位（IRES）を含有するように遺伝子操作されてよいので、そのマーカーは、標的細胞ゲノム中にベクターが組み込まれた位置とはほとんど無関係に発現されるであろう。

【0332】

遺伝子トラップベクターが、感染した宿主細胞のゲノム中にかなりランダムに組み込まれると仮定すると、破壊されたヒトSE P遺伝子を有する遺伝子修飾された細胞は、ランダムなベクター組込みが行われた細胞の集団から識別されなければならない。好ましくは、その細胞集団における遺伝子修飾は、その集団が、それら細胞のゲノム中で見出される本質的にあらゆる遺伝子中で突然変異を示して、破壊されたヒトSE P遺伝子を含む細胞がその集団から識別されることを可能にするように十分なランダムさおよび頻度を有する（Zambrowicz et al., WO99/50426号; Sands et al., WO98/14614号を参照されたい）。

【0333】

破壊されたヒトSE P遺伝子を含有する個々の突然変異細胞系は、突然変異した細胞集団において、例えば、ヒトSE P遺伝子配列中の突然変異を確認するのに逆転写およびPCR（RT-PCR）を用いて識別される。この方法は、クローンをプールすることによって能率的にすることができる。例えば、破壊されたヒトSE P遺伝子を含有する個々のクローンを見出すには、遺伝子トラップベクター中に固定された一つのプライマーおよびヒトSE P遺伝子配列中に位置する別のプライマーを用いてRT-PCRを行う。正のRT-PCR結果は、そのベクター配列がヒトSE P遺伝子転写物中にエンコードされていることを示し、ヒトSE P遺伝子が遺伝子トラップ組込みイベントによって破壊されたことが示される（例えば、Sands et al., WO98/14614号を参照されたい）。

【0334】

時間的、空間的および誘導性の遺伝子破壊

内因性ヒトSE P遺伝子の機能的破壊は、特定の発生段階または細胞周期段階で（時間的破壊）または特定の細胞タイプで（空間的破壊）生じることがありうる。ヒトSE P遺伝子破壊は、ある種の条件が存在する場合、誘導性でもありうる。Cre-Lox系のようなリコンビナーゼ切除系は、特定の発生段階で、特定の組織または細胞タイプで、または特定の環境条件下でヒトSE P遺伝子を活性化させるまたは失活させるのに用いることができる。概して、Cre-Lox技法を利用する方法は、Torres and Kuhn, Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting, Oxford University Press, 1997によって記載のように行われる。Cre-Lox系について記載されたのと類似した方法も、FLP-FRT系を利用して用いることができる。相同的組換えまたはウイルス挿入によって条件付きで遺伝子を破壊するリコンビナーゼ切除系の使用に関する更に別の指針は、例えば、米国特許第5,626,159号、米国特許第5,527,695号、米国特許第5,434,066号、WO98/29533号、Orban et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6861-65, 1992; O'Gormann et al., Science 251:1351-55, 1991; Sauer et al., Nucleic Acids Research 17:147-61, 1989; Barinaga, Science 265:26-28, 1994; および Akagi et al., Nucleic Acids Res. 25:1766-73, 1997に与えられる。一つより多いリコンビナーゼ系を、動物細胞を遺伝子修飾に用いることができる。

【0335】

Cre-Lox系のようなリコンビナーゼ系を用いて、時間的、空間的または誘導性の様式でヒトSEP遺伝子を破壊するのに相長的組換えを用いる場合、ヒトSEP遺伝子コーディング領域の一部分を、loxP部位に隣接したヒトSEP遺伝子コーディング領域を含むターゲティング構築物によって置き換える。この遺伝子修飾を有する動物細胞は、機能的なloxPに隣接したヒトSEP遺伝子を含む。ヒトSEP遺伝子破壊の時間的、空間的または誘導性の側面は、所望の空間的に調節された、時間的に調節された、または誘導性のプロモーターそれぞれの制御下において動物細胞中で発現される、追加の導入遺伝子、すなわち、Creリコンビナーゼ導入遺伝子の発現パターンによってもたらされる。Creリコンビナーゼは、組換えのためのloxP部位を標的とする。したがって、Cre発現が活性化されると、loxP部位で組換えが行われて、挟まれたヒトSEP遺伝子コーディング配列が切除され、ヒトSEP遺伝子の機能的破壊が生じる (Rajewski et al., J. Clin. Invest. 98:600-03, 1996; St.-Onge et al., Nucleic Acids Res. 24:3875-77, 1996; Agah et al., J. Clin. Invest. 100:169-79, 1997; Brocard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14559-63, 1997; Feil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10887-90, 1996; および Kuehn et al., Science 269:1427-29, 1995)。

【0336】

Creリコンビナーゼ導入遺伝子およびloxPに隣接したヒトSEP遺伝子を両方とも含有する細胞は、標準的なトランスジェニック技術によって生じることができる。ヒトSEP遺伝子を時間的、空間的または条件付きで破壊するためのリコンビナーゼ系特異的プロモーターの使用に関する更に別の指針は、例えば、Sauer, Meth. Enz. 225:890-900, 1993, Gu et al., Science 265:103-06, 1994, Araki et al., J. Biochem. 122:977-82, 1997, Dymecki, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:6191-96, 1996、および Meyers et al., Nature Genetics 18:136-41, 1998に見出される。

【0337】

ヒトSEP遺伝子の誘導性破壊は、テトラサイクリン応答性バイナリー系を用いることによって達成することもできる (Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-51, 1992)。この系は、内因性ヒトSEP遺伝子調節要素、およびテトラサイクリンで制御可能なリプレッサー (TetR) を発現する導入遺伝子中に、Tetプロモーターを導入するように細胞を遺伝子修飾することを含む。このような細胞では、テトラサイクリンの投与は、TetRを活性化させ、順次、これがヒトSEP遺伝子発現を阻害し、したがって、ヒトSEP遺伝子を機能的に破壊する (St.-Onge et al., Nucleic Acids Res. 24:3875-77, 1996, 米国特許第5,922,927号)。

【0338】

ヒトSEP遺伝子の時間的、空間的および誘導性の破壊のための上記の系は、例えば、WO 98/29533号に記載のように遺伝子修飾の方法として遺伝子トラップ法を用いる場合に用いることもできる。

【0339】

遺伝子修飾された動物細胞を生じること

遺伝子修飾のための上記の方法は、実質的には動物に由来する体細胞または幹細胞のいずれのタイプでも、ヒトSEP遺伝子を機能的に破壊するのに用いることができる。本発明の遺伝子修飾された動物細胞には、ヒト細胞を含めた哺乳動物細胞、および鳥類細胞が含まれるが、これらに制限されるわけではない。これら細胞は、培養に適応された、腫瘍発

生性のまたは形質転換された細胞系のようないずれかの動物細胞系を遺伝子修飾することに由来してよいし、またはそれらは、所望のヒトSEP遺伝子修飾を有する遺伝子修飾された非ヒト動物から単離されてよい。

【0340】

これら細胞は、破壊されたヒトSEP遺伝子についてヘテロ接合性であってよいしまたはホモ接合性であってよい。ヒトSEP遺伝子破壊についてホモ接合性である細胞（ヒトSEP^{-/-}）を得るために、両方の対立遺伝子の直接的な逐次的ターゲッティングを行うことができる。この方法は、正の選択可能マーカーを再循環することによって容易にすることができる。このスキームにより、正の選択可能マーカーをエンコードしているヌクレオチド配列は、Cre-LoxP系を用いた一つの対立遺伝子の破壊後に除去される。したがって、同様のベクターは、次の回のターゲッティングにおいて、第二のヒトSEP遺伝子対立遺伝子を破壊するのに用いることができる（Abuin and Bradley, Mol. Cell. Biol. 16:1851-56, 1996; Sedivy et al., T. I. G. 15:88-90, 1999; Cruz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:7170-74, 1991; Mortensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:7036-40, 1991; te Riele et al., Nature (London) 348:649-651, 1990)。

10

【0341】

ヒトSEP^{-/-}であるES細胞を得るための別の戦略は、ヒトSEP遺伝子破壊にヘテロ接合性である細胞（ヒトSEP^{+/-}）の集団からの細胞のホモジナイゼーションである。この方法は、選択可能薬物耐性マーカーを発現するヒトSEP^{+/-}標的クローンを、極めて高い薬物濃度に対して選択するスキームを用いるが、この選択は、薬物耐性マーカーをエンコードしている配列の二つのコピーを発現する、したがって、ヒトSEP遺伝子破壊にホモ接合性である細胞に有利である（Mortensen et al., Mol. Cell. Biol. 12:2391-95, 1992）。

20

【0342】

所望の細胞または細胞系の遺伝子修飾後、ヒトSEP遺伝子座は、標準的なPCRによるPCR分析または当該技術分野において知られているサザンブロッティング法によって修飾部位として確かめることができる（例えば、米国特許第4,683,202号；および Erlich et al., Science 252:1643, 1991 を参照されたい）。ヒトSEP遺伝子の機能的破壊の更に別の立証は、ヒトSEP遺伝子メッセンジャーRNA (mRNA) レベルおよび／またはヒトSEPポリペプチドレベルが、正常にヒトSEP遺伝子を発現する細胞中で減少するかどうかで行うこともできる。ヒトSEP遺伝子mRNAレベルの尺度は、逆転写酵素に媒介されるポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、ノーザンブロット分析または in situ ハイブリダイゼーションを用いることによって得ることができる。細胞によって生産されるヒトSEPポリペプチドの定量化は、例えば、当該技術分野において知られている標準的な免疫検定法によって行うことができる。このような免疫検定には、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベント検定）、“サンドイッチ”免疫検定、イムノラジオメトリックアッセイ、

30

40

【0343】

好ましい遺伝子修飾された動物細胞は、胚性幹 (ES) 細胞およびES様細胞である。これら細胞は、マウス (Evans et al., Nature 129:154-156, 1981; Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7634-7638, 1981)、ブタおよびヒツジ (Notanianni et al., J. Reprod. Fert. Suppl., 43:255-260,

50

1991; Campbell et al., Nature 380:64-68, 1996)、およびヒトを含めた霊長類(Thomson et al., 米国特許第5,843,780号, Thomson et al., Science 282:1145-1147, 1995; および Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844-7848, 1995)などのいろいろな種の着床前の胚および胚盤胞に由来する。

【0344】

これらのタイプの細胞は、多能性である。すなわち、適当な条件下において、それらは、3種類全ての胚葉、すなわち、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来するいろいろな細胞タイプに分化する。培養条件に依り、ES細胞の試料は、幹細胞として無制限に培養されて、単一試料内でいろいろな異なった細胞タイプに分化させることができるし、またはマクロファージ様細胞、ニューロン細胞、心筋細胞、脂肪細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、骨格筋細胞、角化細胞、および好酸球、マスト細胞、赤芽球前駆細胞または巨核球などの造血細胞のような特定の細胞タイプに分化するように支配されることができる。支配された分化は、例えば、Keller et al., Curr. Opin. Cell Biol. 7:862-69, 1995, Li et al., Curr. Biol. 8:971, 1998, Klug et al., J. Clin. Invest. 98:216-24, 1996, Lieschke et al., Exp. Hematol. 23:328-34, 1995, Yamane et al., Blood 90:3516-23, 1997, および Hirashima et al., Blood 93:1253-63, 1999 に更に記載されるように、その培養条件において特異的増殖因子またはマトリックス成分を含むことによって達せられる。

【0345】

遺伝子修飾に用いられる具体的な胚性幹細胞系は重要ではないが、典型的なネズミES細胞系には、AB-1 (McMahon and Bradley, Cell 62:1073-85, 1990)、E14 (Hooper et al., Nature 326:292-95, 1987)、D3 (Doetschmann et al., J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45, 1985)、CCE (Robertson et al., Nature 323:445-48, 1986)、RW4 (Genome Systems, St. Louis, MO) および DBA/11a cJ (Roach et al., Exp. Cell Res. 221:520-25, 1995) が含まれる。

【0346】

ポリペプチドの製造

本発明によれば、本発明のポリペプチドの製造は、例えば、本発明の一つまたはそれを越えるポリヌクレオチドで形質転換された微生物発現宿主を慣用的な栄養発酵培地中で培養することによって行うことができる。適当な培地の選択は、発現宿主の選択に基づいておよび/または発現構築物の調節必要条件に基づいてよい。このような培地は、当業者に周知である。所望ならば、この培地は、潜在的に混入している他の微生物よりも形質転換された発現宿主に有利な追加の成分を含有してよい。

【0347】

したがって、本発明は、更に、ヒトSEP活性を有するポリペプチドを製造する方法であって、(a) 配列番号: 1または配列番号: 5に示されるヌクレオチド配列またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメントで宿主細胞を形質転換し;そして(b) その形質転換された宿主細胞を、このポリペプチドの発現に適した条件下で培養する工程を含む方法を提供する。

【0348】

本発明は、更に、ヒトSEP活性を有するポリペプチドを製造する方法であって、(a) 配列番号: 1または配列番号: 5に示されるヌクレオチド配列またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメントで形質転換された宿主細胞を、このポリペプチドの発現に

適した条件下で培養し；そして（b）このポリペプチドを宿主細胞培養物から回収する工程を含む方法に関する。

【0349】

本発明は、更に、ヒトSE P活性を有するポリペプチドを製造する方法であって、（a）配列番号：1または配列番号：5に示されるヌクレオチド配列またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメントで宿主細胞を形質転換し；（b）この形質転換された宿主細胞を、このポリペプチドの発現に適した条件下で培養し；そして（c）このポリペプチドを宿主細胞培養物から回収する工程を含む方法に関する。

【0350】

リボザイム

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイム作用機作は、相補的な標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションに続く内ヌクレオチド結合分解性の切断（endonucleolytic cleavage）を含む。本発明の範囲内にあるのは、ヒトSE P RNA配列の内ヌクレオチド結合分解性の切断を特異的に且つ効率よく触媒するよう設計されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子である。

【0351】

いずれか可能なRNA標的中の特異的リボザイム切断部位は、次の配列、GUA、GUUおよびGUCが含まれるリボザイム切断部位について標的分子を走査することによって最初に識別される。いったん識別されると、この切断部位を含有する標的遺伝子の領域に該当する15～20リボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチド配列を機能不能にすることがありうる二次構造特徴について評価することができる。候補標的の適合性も、リボヌクレアーゼ保護検定を用いて、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションについての接近容易性を調べることによって評価することができる。

【0352】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA両方の分子およびリボザイムは、RNA分子の合成について当該技術分野において知られているいずれかの方法によって製造することができる。これらには、固相ホスホルアミダイト化学合成のような、オリゴヌクレオチドを化学合成する技法が含まれる。或いは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をエンコードしているDNA配列の*in vitro*または*in vivo*転写によって生じることができる。このようなDNA配列は、T7またはSP6のような適当なRNAポリメラーゼプロモーターと一緒にいろいろなベクター中に包含させることができる。或いは、アンチセンスRNAを構成的にまたは誘導的に合成するアンチセンスcDNAを、細胞系、細胞または組織中に導入することができる。

【0353】

検出

ヒトSE Pポリヌクレオチドコーディング配列の存在は、配列番号：1または配列番号：5に示される配列のプロブ、一部分またはフラグメントを用いたDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって検出することができる。核酸増幅に基づく検定は、ヒトSE P DNAまたはRNAを含有する形質転換体を検出するための、ヒトSE Pコーディング配列に基づくオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの使用を含む。本明細書中で用いられる“オリゴヌクレオチド”または“オリゴマー”は、少なくとも約10ヌクレオチドおよび約60ヌクレオチド程度の、好ましくは、好ましくは、約15～30ヌクレオチド、そしてより好ましくは、プロブまたはアンプリマー（*amp l i m e r*）として用いることができる約20～25ヌクレオチドの核酸配列を意味してよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号：1または配列番号：5に示されるヌクレオチド配列の3'領域に由来する。

【0354】

タンパク質に特異的な多クローン性抗体かまたは単クローン性抗体を用いることによるような、ヒトSE Pポリペプチドの発現を検出するおよび測定する種々のプロトコールは、

10

20

30

40

50

当該技術分野において知られている。例には、酵素結合イムノソルベント検定 (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A) および蛍光活性化セルソーティング (F A C S) が含まれる。ヒト S E P ポリペプチド上の二つの非干渉性エピトープに反応性の単クローン性抗体を用いる単クローン性二部位免疫検定 (two-site, monoclonal-based immunoassay) が好適であるが、競合的結合検定を用いてよい。これらおよび他の検定は、特に、Hampton Ret al. (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, USA) および Maddox DE et al. (1983, J. Exp. Med., 158:1211) に記載されている。

【0355】

10

いろいろな標識および接合技術は、当業者に知られており、種々の核酸およびアミノ酸検定で用いることができる。ヒト S E P ポリヌクレオチド配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションまたは P C R プローブを生じる手段には、標識ヌクレオチドを用いるオリゴラベリング、ニックトランスレーション、エンドラベリングまたは P C R 増幅が含まれる。或いは、ヒト S E P コーディング配列またはそのいずれか一部分を、mRNA プローブの製造のためのベクター中にクローン化してよい。このようなベクターは、当該技術分野において知られているし、市販されており、そして T 7、T 3 または S P 6 のような適当な RNA ポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドの付加によって in vitro で RNA プローブを合成するのに用いることができる。

【0356】

20

Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA)、Promega (Madison, WI, USA) および US Biochemical Corporation (Cleveland, OH, USA) のような多数の会社は、これら手順のための市販のキットおよびプロトコルを供給している。適当なレポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤または発色剤、並びに基質、補助因子、阻害剤、磁性粒子等が含まれる。このような標識の使用を教示する特許には、US-A-3817837号；US-A-3850752号；US-A-3939350号；US-A-3996345号；US-A-4277437号；US-A-4275149号；およびUS-A-4366241号が含まれる。更に、組換え免疫グロブリンを、US-A-4816567号に示されるように生じることができる。

30

【0357】

特定の分子の発現を定量する更に別の方法には、ヌクレオチドを放射性標識すること (Melby PC et al., 1993, J. Immunol. Methods, Vol 159, pp. 235-244) またはビオチニル化すること (Duplaa C et al., 1993, Annal Biochem., Vol 229, p. 36)、対照核酸の共増幅、および実験結果を補間する標準曲線が含まれる。多重試料の定量化は、E L I S A フォーマットで検定を実施することによって迅速化することができるが、この場合、目的のオリゴマーは、いろいろな希釈度で与えられ、分光測光または熱量測定応答が迅速な定量化を生じる。

【0358】

40

マーカー遺伝子発現の存在／不存在は、目的の遺伝子も存在するということを示唆するが、その存在および発現は、確かめられるべきである。例えば、ヒト S E P コーディング配列をマーカー遺伝子配列内に挿入する場合、ヒト S E P コーディング領域を含有する組換え細胞は、マーカー遺伝子機能の不存在によって識別することができる。或いは、マーカー遺伝子は、単一プロモーターの制御下にあるヒト S E P コーディング配列と一緒にタンデムに置かれることができる。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は、通常、ヒト S E P の発現も示す。

【0359】

或いは、ヒト S E P のコーディング配列を含有し且つヒト S E P コーディング領域を発現する宿主細胞は、当業者に知られている種々の手順によって識別することができる。これ

50

ら手順には、核酸またはタンパク質の検出および／または定量化のためのメンブラン、溶液またはチップを基剤とする技術を含めた、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質バイオアッセイまたは免疫検定技術が含まれるが、これらに制限されるわけではない。

【0360】

抗体

本発明のアミノ酸配列は、標準的な技法の使用によるように、そのアミノ酸配列に対する抗体を生じるのに用いることもできる。

【0361】

当該技術分野において周知の手順は、ヒトSEPPポリペプチドへの抗体の産生に用いることができる。このような抗体には、多クローン性、単クローン性、キメラ、単鎖、FabフラグメントおよびFab発現ライブラリーによって生じるフラグメントが含まれるが、これらに制限されるわけではない。中和抗体、すなわち、ヒトSEPPポリペプチドの生物学的活性を阻害する抗体は、診断薬および治療薬に特に好適である。

【0362】

抗体の産生には、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス等を含めた種々の宿主を、免疫原性を保持する阻害剤またはそのいずれか一部分、変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体またはオリゴペプチドの注射によって免疫感作することができる。宿主の種に依り、種々のアジュバントを用いて免疫学的応答を増加させることができる。このようなアジュバントには、フロイント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、およびリゾレシチン、ブル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、キーホールリンペットヘモシアニンおよびジニトロフェノールのような界面活性物質が含まれるが、これらに制限されるわけではない。BCG（カルメット・گران桿菌（*Bacilli Calmette-Guerin*））およびコリネバクテリウム・パルヴム（*Corynebacterium parvum*）は、用いることができる潜在的に有用なヒトアジュバントである。

【0363】

アミノ酸配列への単クローン性抗体は、培養中の連続的継代細胞系によって抗体分子を産生させるいずれかの技術を用いて製造することもできる。これらには、Koehler and Milstein によって最初に記載されたハイブリドーマ技術（1975, *Nature*, Vol 256, pp. 495-497）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kosbor et al., (1983), *Immunol. Today*, Vol 4, p. 72; Cote et al., (1983), *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, Vol 80, pp. 2026-2030）およびEBVハイブリドーマ技術（Cole et al., (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss Inc., pp. 77-96）が含まれるが、これらに制限されるわけではない。更に、“キメラ抗体”の産生のために開発された技術である、適当な抗原特異性および生物学的活性を有する分子を得るためのヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシングを用いることができる（Morris et al., (1984), *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, Vol 81, pp. 6851-6855; Neuberger et al., (1984), *Nature*, Vol 312, pp. 604-608; Takeda et al., (1985), *Nature*, Vol 314, pp. 452-454）。或いは、単鎖抗体の産生について記載された技術（US-A-4946779号）は、阻害剤特異的単鎖抗体を生じるのに適応することができる。

【0364】

抗体は、リンパ球集団において *in vivo* 産生を引き起こすことによって、または Orlandi et al. (1989, *Proceedings of the Nat*

ional Academy of Sciences (USA), Vol 86, pp. 3833-3837) および Winter G and Milstein C (1991; Nature, Vol 349, pp. 293-299) に開示されたように、極めて特異的な結合性試薬の組換え免疫グロブリンライブラリーまたはパネルをスクリーニングすることによって生じることでもある。

【0365】

ヒトSEPへの特異的結合部位を含有する抗体フラグメントを生じることでもある。例えば、このようなフラグメントには、抗体分子のペプシン消化によって生じることができる $F(ab')_2$ フラグメント、およびこの $F(ab')_2$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元させることによって生じることができる Fab フラグメントが含まれるが、これらに制限されるわけではない。或いは、Fab 発現ライブラリーを、所望の特異性での単クローン性 Fab フラグメントの迅速且つ容易な識別を可能にするように構築することができる (Huse WD et al., (1989), Science, Vol 256, pp. 1275-1281)。

【0366】

別の技術は、例えば、ファージが、そのコート表面上で scFv フラグメントをいろいろな相補性決定領域 (CDR) とともに発現する場合のファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることを含む。この技術は、当該技術分野において周知である。

【0367】

ヒトSEP特異的抗体は、ヒトSEPポリペプチドの発現に関連した状態および疾患の診断に有用である。確定された特異性を有する多クローン性抗体かまたは単クローン性抗体を用いる競合的結合検定またはイムノラジオメトリックアッセイの種々のプロトコールは、当該技術分野において周知である。このような免疫検定は、典型的に、ヒトSEPポリペプチドとその特異的抗体（または類似したヒトSEP結合性分子）との間の複合体の形成、および複合体形成の測定を含む。特異的ヒトSEPタンパク質上の二つの非干渉性エピトープに反応性の単クローン性抗体を用いる単クローン性二部位免疫検定は好適であるが、競合的結合検定を用いてもよい。これら検定は、Maddox DE et al. (1983, Journal of Experimental Medicine, Vol 158, p. 1211) に記載されている。

【0368】

抗ヒトSEP抗体は、異常なペプチドシグナリングを伴う障害、またはヒトSEPの異常な発現を特徴とする他の障害または疾患の診断に有用である。ヒトSEPの診断検定には、ヒト体液、細胞、組織、またはこのような組織の切片または抽出物中でヒトSEPポリペプチドを検出するために抗体および標識を利用する方法が含まれる。本発明のポリペプチドおよび抗体は、修飾してまたは修飾することなく用いることができる。しばしば、これらポリペプチドおよび抗体は、レポーター分子とそれらを共有結合によってかまたは非共有結合によって連結することにより標識されるであろう。いろいろなレポーター分子が当業者に知られている。

【0369】

抗体は、生物試料中に存在する本発明のポリペプチドを、(a) 本発明の抗体を提供し；(b) 生物試料をこの抗体と一緒に、抗体-抗原複合体を形成させる条件下でインキュベートし；そして(c) この抗体を含む抗体-抗原複合体が形成されるかどうか確認することを含む方法によって検出する方法で用いることができる。

【0370】

これら状況に依って、適当な試料には、精巣または脳のような摘出組織、またはこのような組織に由来する腫瘍性新生物が含まれうる。

本発明の抗体は、固体支持体に結合されてよいし、および／または適当な試薬、対照、取扱い説明書等と一緒に、適当な容器中のキットにパッケージされていてよい。

【0371】

検定／識別方法

10

20

30

40

50

本発明は、更に、（ヒト細胞のような）細胞中のヒト S E P の存在を検出する検定方法であって、（a）このような細胞からの（全 R N A のような）R N A について、配列番号：1 または配列番号：5 に示される D N A 配列またはその対立遺伝子変異から決定されるようなヒト S E P に特異的である 1 対の P C R プライマーを用いて逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応（R T－P C R）を行い；そして（b）適当なサイズの P C R フラグメントの出現を、アガロースゲル電気泳動などによって検定することを含む方法に関する。

【0372】

本発明は、更に、ヒト S E P の活性および／またはその発現に（阻害するまたはそれ以外には修飾するなどの）影響を与える試剤（化合物、それを含む他の物質または組成物など）を識別する方法であって、ヒト S E P またはそれをコードするヌクレオチド配列をその試剤と接触させた後、ヒト S E P の活性および／またはその発現を測定することを含む方法に関する。

10

【0373】

本発明は、更に、ヒト S E P の活性および／またはその発現に（選択的に阻害するまたはそれ以外には選択的に修飾するなどの）選択的に影響を与える試剤（化合物、それを含む他の物質または組成物など）を識別する方法であって、ヒト S E P またはそれをコードするヌクレオチド配列をその試剤と接触させた後、ヒト S E P の活性および／またはその発現を測定することを含む方法に関する。

【0374】

本発明は、更に、ヒト S E P の活性および／またはその発現に（阻害するまたはそれ以外には修飾するなどの）影響を与える試剤（化合物、それを含む他の物質または組成物など）を識別する方法であって、ヒト S E P の活性および／またはその発現を、（a）配列番号：1 または配列番号：5 に示される D N A 配列またはその対立遺伝子変異を含む組換え D N A を包含している細胞系、または（b）ヒト S E P を天然に選択的に発現する細胞集団または細胞系中において、その試剤の存在下でまたはその試剤を添加後に測定することを含む方法に関する。好ましくは、ヒト S E P の活性は、上記の検定方法によって決定される。

20

【0375】

本発明は、更に、ヒト S E P の活性および／またはその発現に（選択的に阻害するまたはそれ以外には選択的に修飾するなどの）選択的に影響を与える試剤（化合物、それを含む他の物質または組成物など）を識別する方法であって、ヒト S E P の活性および／またはその発現を、（a）配列番号：1 または配列番号：5 に示される D N A 配列またはその対立遺伝子変異を含む組換え D N A を包含している細胞系、または（b）ヒト S E P を天然に選択的に発現する細胞集団または細胞系中において、その試剤の存在下でまたはその試剤を添加後に測定することを含む方法に関する。好ましくは、ヒト S E P の活性は、上記の検定方法によって決定される。

30

【0376】

本発明は、更に、ヒト S E P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）活性またはそれ（その誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメントを含めた）をコードするヌクレオチド配列の発現のモジュレーション（好ましくは、特異的モジュレーション）について試剤をスクリーニングする方法であって、（a）候補試剤を提供し；（b）ヒト S E P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列とその候補試剤とを、適当な条件下でモジュレーションさせるのに十分な時間混合し；そして（c）その候補試剤がヒト S E P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）活性またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列の発現をモジュレートするかどうか確かめるために、その候補試剤によるヒト S E P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列のモジュレーションを検出する工程を含む方法に関する。

40

50

【0377】

本発明は、更に、ヒトSE P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（その誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメントを含めた）をコードするヌクレオチド配列との特異的結合親和性について試剤をスクリーニングする方法であって、（a）候補試剤を提供し；（b）ヒトSE P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列とを、適当な条件下で結合させるのに十分な時間混合し；そして（c）その候補試剤がヒトSE P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列に結合するかどうか確かめるために、ヒトSE P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列への候補試剤の結合を検出する工程を含む方法に関する。

10

【0378】

本発明は、更に、ヒトSE Pをモジュレートすることができる試剤を識別する方法であって、（a）その試剤を、ヒトSE P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列と接触させ；（b）工程（a）の混合物を生物活性ペプチドと一緒に、その生物活性ペプチドのタンパク質分解に適した条件下でインキュベートし；（c）生物活性ペプチドタンパク質分解の量を測定し；そして（d）工程（c）の生物活性ペプチドタンパク質分解の量と、その試剤を含むことなくインキュベートされたヒトSE P（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）またはそれ（またはその誘導体、ホモログ、変異体またはフラグメント）をコードするヌクレオチド配列について得られる生物活性ペプチドタンパク質分解の量とを比較し、それによって、その試剤が生物活性ペプチドタンパク質分解に（阻害するまたは選択的に阻害するなどの）影響を与えるかどうか確認する工程を含む方法に関する。

20

【0379】

したがって、本発明の一定の態様において、ヒトSE Pまたはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体、および／またはヒトSE Pまたはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体を発現する細胞系は、エンドペプチダーゼ活性のモジュレーターとして作用する抗体、ペプチド、または有機または無機分子のような他の試剤について、またはそれらの発現についてスクリーニングし、それによって、生物活性ペプチドレベルをモジュレートすることができる治療薬を識別するのに用いることができる。例えば、ヒトSE Pの活性を中和することができる抗ヒトSE P抗体は、生物活性ペプチドのヒトSE Pタンパク質分解を阻害し、それによって、それらのレベルを増加させるのに用いることができる。或いは、組換え発現されたヒトSE Pまたはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体、またはヒトSE Pまたはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体を発現する細胞系を用いる組合せ化学によって作られるペプチドライブラリーまたは有機ライブラリーのスクリーニングは、生物活性ペプチドのヒトSE Pによるタンパク質分解をモジュレートすること（例えば、阻害することまたは選択的に阻害すること）によって機能する治療薬の識別に有用でありうる。合成化合物、天然物、および他の潜在的に生物学的に活性な物質源は、当業者にとって常套的であると考えられる多数の方法でスクリーニングすることができる。例えば、ヒトSE PのN末端領域をエンコードしているヌクレオチド配列は、細胞系中で発現させることができるが、これは、ヒトSE P活性のアゴニストかまたはアンタゴニストであるアロステリックモジュレーターをスクリーニングするのに用いることができる。或いは、ヒトSE Pの保存触媒ドメインをエンコードしているヌクレオチド配列を、細胞系中で発現させて、生物活性ペプチドタンパク質分解の阻害剤または選択的阻害剤についてスクリーニングするのに用いることができる。

30

40

【0380】

ヒトSE P活性または生物活性ペプチドタンパク質分解を妨げる試験薬の能力は、ヒトS

50

E P レベルまたは生物活性ペプチドレベルを測定することによって決定することができる。

【0381】

したがって、本発明は、ヒト S E P またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体の生物活性ペプチドタンパク質分解活性をモジュレートすることができる化合物を識別する方法であって、(a) その化合物を、ヒト S E P またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体と接触させ；(b) 工程 (a) の混合物を生物活性ペプチドと一緒に、その生物活性ペプチドのタンパク質分解に適した条件下でインキュベートし；(c) 生物活性ペプチドタンパク質分解の量を測定し；そして (d) 工程 (c) の生物活性ペプチドタンパク質分解の量と、その化合物を含むことなくインキュベートされたヒト S E P またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体について得られる生物活性ペプチドタンパク質分解の量とを比較し、それによって、その化合物が生物活性ペプチドタンパク質分解を刺激するまたは阻害するかどうか決定する工程を含む方法に関する。この方法の一つの態様において、フラグメントは、ヒト S E P の N 末端領域からであってよく、ヒト S E P のアロステリックモジュレーターを識別する方法を提供する。本発明のもう一つの態様において、このフラグメントは、ヒト S E P のカルボキシ末端領域からであってよく、生物活性ペプチドタンパク質分解の阻害剤または選択阻害剤を識別する方法を提供する。

10

【0382】

これら生物活性ペプチドは、完全長であってよいしまたはそのフラグメントであってよく、組換えによって、または好ましくは、合成によって生じることができる。好ましくは、これら生物活性ペプチドは、ヒト S E P によってモジュレートされる（好ましくは、タンパク質分解／加水分解によって切断される）ことができる低分子量合成ペプチドである。より好ましくは、これら合成ペプチドを標識する（好ましくは、蛍光標識、より好ましくは、本明細書中に記載の F R E T 検定で用いることができるような分子内消光性蛍光原性色素で蛍光標識する）。

20

【0383】

ヒト S E P は、生物活性ペプチド活性を調節することおよび／または生物学的に不活性なペプチドのそれらの活性型へのタンパク質分解に関与しうるので、上記の“生物活性ペプチド（類）”（および同種のもの）への言及は、これら言及が必要な変更を加えて解釈するためにある場合について、適宜、“生物学的に不活性なペプチド（類）”（および同種のもの）への言及を意味するとみなすこともできる。例えば、ヒト S E P 活性の阻害が、増加したレベルの生物活性ペプチド（類）をもたらすかもしれない場合、このような阻害は、更に、または代わりに、増加したレベルの生物学的に不活性なペプチド（類）をもたらし、それによって、それらの“活性型”のペプチド（類）の減少したレベルをもたらすかもしれない。

30

【0384】

ヒト S E P ポリペプチド、その免疫原性フラグメントまたはそのオリゴペプチドは、種々の薬物スクリーニング技術のいずれにおいても治療的化合物をスクリーニングするのに用いることができる。このような試験で用いられるポリペプチドは、溶液中でフリーであってよいし、固体支持体に固着されていてよいし、細胞表面上にあってよいし、または細胞内に位置していてよい。活性の消滅またはヒト S E P ポリペプチドと試験される試剤との間の結合性複合体の形成は、測定することができる。

40

【0385】

したがって、本発明は、ヒト S E P またはその発現、またはその一部分またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体のモジュレーション（好ましくは、特異的結合親和性または阻害のような特異的モジュレーション）について一つまたは複数の化合物をスクリーニングする方法であって、一つまたは複数の化合物を提供し；ヒト S E P またはそれをコードするヌクレオチド配列またはその一部分またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体と、一つまたは複数の化合物各々とを、適当な条件下でモジュレーシ

50

ョンさせるのに十分な時間混合し；そして例えば、(i) 複数の化合物各々へのヒト S E P、またはその一部分またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体の結合を検出し、それによって、ヒト S E P またはそれをコードするヌクレオチド配列をモジュレートする一つまたは複数の化合物を識別すること；または (i i) 複数の化合物各々によるヒト S E P、またはその一部分またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体の阻害を検出し、それによって、ヒト S E P またはそれをコードするヌクレオチド配列をモジュレートする（阻害する）一つまたは複数の化合物を識別することを含む方法に関する。このような検定において、これら複数の化合物は、当業者に知られている組合せ化学技術によって生じることができる。

【0386】

薬物スクリーニングのためのもう一つの技法は、ヒト S E P ポリペプチドへの適当な結合親和性を有する化合物の高処理スクリーニング（H T S）に提供され、1984年9月13日公開の G e y s e n, W O 84/03564号に詳細に記載された方法に基づいている。要約すると、多数の異なる低分子量ペプチド試験化合物を、プラスチックピンまたは何か他の表面のような固体支持体上で合成する。これらペプチド試験化合物を、ヒト S E P フラグメントと反応させ、洗浄する。次に、結合したヒト S E P を、当該技術分野において周知の方法を適当に適応することなどによって検出する。精製されたヒト S E P は、上述の薬物スクリーニング技術で用いるためにプレート上に直接的にコーティングすることもできる。或いは、非中和抗体を、そのペプチドを捕捉し且つそれを固体支持体上に固定するために用いることができる。

【0387】

本発明は、更に、ヒト S E P を結合することができる中和抗体が、ヒト S E P を結合することについて試験化合物と特異的に競合する競合的薬物スクリーニング検定の使用を包含する。この方式では、これら抗体は、一つまたはそれを越える抗原決定基をヒト S E P と共有するいずれかのペプチドの存在を検出するのに用いることができる。

【0388】

本発明の検定方法は、高処理スクリーニング（H T S）であってよい。この点で、W O 84/03564号の教示は、本発明のヒト S E P に適応することができる。

【0389】

U S - A - 5738985号の教示は、本発明の検定方法に適応することができる。

試剤

本発明は、更に、本発明の検定方法および識別方法によって識別される一つまたはそれを越える試剤を提供する。

【0390】

本発明の試剤は、例えば、有機化合物または無機化合物でありうる。この試剤は、例えば、配列番号：1または配列番号：5に示される配列の全部または一部分についてアンチセンスであるヌクレオチド配列でありうる。好ましくは、この試剤は、S E P 活性のモジュレーター、より好ましくは、S E P 阻害剤（S E P i）または選択的 S E P i であろう。

【0391】

S E P i は、S E P の酵素活性を阻害する、すなわち、それが基質ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を（タンパク質分解によって）切断するのを妨げる化合物である。

【0392】

本発明は、更に、薬剤として用いるための本発明の試剤（またはその薬学的に許容しうる塩またはその薬学的に許容しうる溶媒和化合物さえも）または前述のいずれかを含有する医薬組成物を提供する。

【0393】

本発明は、更に、泌尿生殖器系、心臓血管系、神経系および内分泌系のいずれか一つまたはそれを越えるものにおける、ヒト S E P 活性に（阻害する、選択的に阻害する、モジュレートするまたは拮抗するなどの）影響を与える試剤の使用に関する。

【0394】

診断薬

本発明は、更に、ヒト S E P ポリヌクレオチド配列の検出のための診断用組成物を提供する。この診断用組成物は、配列番号：1 または配列番号：5 に示される配列またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体、または配列番号：1 または配列番号：5 に示されるヌクレオチド配列またはその対立遺伝子変異の全部または一部分にハイブリッド形成することができる配列を含んでいてよい。

【0395】

疾患の診断のための基準を提供するには、ヒト S E P ポリペプチド発現からの正常値または標準値を決定すべきである。これは、動物かまたはヒトである正常対象から得られる体液または細胞抽出物（例えば、精巣から）と、ヒト S E P ポリペプチドへの抗体とを、当該技術分野において周知である複合体形成に適した条件下で混合することによって達せられる。標準的な複合体形成の量は、既知量の抗体が既知濃度の精製ヒト S E P ポリペプチドと混合されている陽性対照の希釈列にそれを比較することによって定量することができる。次に、正常な試料から得られる標準値を、ヒト S E P ポリペプチド発現に関係がある障害または疾患に潜在的に罹患している対象からの試料により得られる値と比較することができる。標準値と対象値との間の偏差は、その疾患状態の存在を確定する。

10

【0396】

ヒト S E P ポリヌクレオチドまたはそのいずれか一部分は、診断用化合物および／または治療的化合物の基準を提供することができる。診断目的には、ヒト S E P ポリヌクレオチド配列を用いて、ヒト S E P 活性が関連していることがありうる状態、障害または疾患における遺伝子発現を検出し且つ定量することができる。

20

【0397】

ヒト S E P をエンコードしているポリヌクレオチド配列は、ヒト S E P の発現に起因する疾患の診断に用いることができる。例えば、ヒト S E P をエンコードしているポリヌクレオチド配列は、ヒト S E P 発現の異常を検出するために、血清、滑液または腫瘍生検のような、生検または剖検からの組織または体液のハイブリダイゼーション検定または P C R 検定で用いることができる。このような定性的または定量的方法の形態には、サザンまたはノーザン分析、ドットプロットまたは他のメンブランを基剤とする技術；P C R 技術；ディップスティック、ピンまたはチップ技術；および E L I S A または他の多重試料フォーマット技術が含まれる。これら技術は全て、当該技術分野において周知であり、実際上、多数の市販の診断用キットの基準である。

30

【0398】

このような検定は、具体的な治療処置計画の効力を評価するために調整されてよいし、動物実験、臨床試験、または個々の患者の処置を監視する場合に用いることができる。疾患の診断用の基準を提供するためには、ヒト S E P 発現についての正常または標準のプロフィールを決定すべきである。これは、動物かまたはヒトである正常対象から得られる体液または細胞抽出物と、ヒト S E P またはその一部分とを、ハイブリダイゼーションまたは増幅に適した条件下で混合することによって達せられる。標準的なハイブリダイゼーションは、正常対象について得られる値と、既知量の精製ヒト S E P が用いられている同様の実験で行われる陽性対照の希釈列とを比較することによって定量することができる。正常な試料から得られる標準値は、ヒト S E P コーディング配列の発現に関係がある障害または疾患に潜在的に罹患している対象からの試料により得られる値と比較することができる。標準値と対象値との間の偏差は、その疾患状態の存在を確定する。疾患が確定された場合、既存の治療薬を投与し、そして処置プロフィールまたは値を生じることができる。最終的には、その検定を一定の基準で繰り返して、それら値が正常または標準のパターンに向かって進行するまたは復帰するかどうか評価することができる。成功した処置プロフィールは、数日間または数ヶ月間にわたる処置の効力を示すのに用いることができる。

40

【0399】

本発明は、更に、例えば、疾患状態におけるヒト S E P レベルを診断用に検出し且つ定量するのに用いることができる抗ヒト S E P 抗体を生じるための、ヒト S E P ポリペプチド

50

、またはその変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体の使用に関する。

【0400】

本発明は、更に、正対照として用いることができる精製されたヒト S E P および抗ヒト S E P 抗体を含む、細胞および組織中のヒト S E P の検出のための診断用検定およびキットに関する。このような抗体は、ヒト S E P タンパク質の発現、またはその欠失体、変異体、ホモログ、フラグメントまたは誘導体の発現に関係があるいずれかの疾患状態または状態を検出するための、溶液、メンブランまたは組織を基剤とする技術で用いることができる。

【0401】

プローブ

本発明のもう一つの側面は、ヒト S E P コーディング領域または対立遺伝子などの密接に関係した分子をエンコードしている、ゲノム配列を含めたポリヌクレオチド配列を検出することができる核酸ハイブリダイゼーションまたは P C R プローブの規定である。プローブの特異性、すなわち、それが高度に保存された、保存されたまたは非保存の領域またはドメインに由来するかどうか、およびハイブリダイゼーションまたは増幅の（高、中または低）ストリンジェンシーは、そのプローブが、天然に存在するヒト S E P コーディング配列または関係のある配列だけを識別するかどうか決定するであろう。関係のある核酸配列の検出のためのプローブは、3'領域のようなヒト S E P ファミリーメンバーの保存されたまたは高度に保存されたヌクレオチド領域から選択され、しかもこのようなプローブは、縮重プローブのプールで用いることができる。同一ヌクレオチド配列、または最大の 20 特異性が望まれる場所の検出ために、核酸プローブは、非保存ヌクレオチド領域またはヒト S E P ポリヌクレオチドの独特の領域から選択される。本明細書中で用いられる“非保存ヌクレオチド領域”という用語は、本明細書中に開示されるヒト S E P コーディング配列に独特であり、既知の S E P のような関係のあるファミリーメンバーに存在しないヌクレオチド領域を意味する。

【0402】

P C R は、U S - A - 4 6 8 3 1 9 5 号、U S - A - 4 8 0 0 1 9 5 号および U S - A - 4 9 6 5 1 8 8 号に記載のように、ヒト S E P 配列に基づくオリゴヌクレオチドについて更に別の使用を提供する。このようなオリゴマーは、概して、化学合成されるが、それらは、酵素的に生じてよいまたは組換え体源から製造されてよい。オリゴマーは、概して 30 、二つのヌクレオチド配列、すなわち、特定の遺伝子または状態の識別に最適にされた条件下で用いられるセンス配向（5'→3'）のものおよびアンチセンス配向（3'←5'）のものを含む。同じ二つのオリゴマー、すなわち、n e s t e d セットのオリゴマー、またはオリゴマーの縮重プールさえも、密接に関係した D N A または R N A 配列の検出および／または定量化のために、低いストリンジェント条件下で用いることができる。

【0403】

ヒト S E P の核酸配列は、内因性ゲノム配列をマッピングするために、前に記載されたようなハイブリダイゼーションプローブを生じるのに用いることもできる。この配列は、周知の技法を用いて、特定の染色体にまたはその染色体の特異的領域にマッピングすることができる。これらには、染色体拡大（c h r o m o s o m a l s p r e a d）への i n 40 s i t u ハイブリダイゼーション（V e r m a e t a l . (1988) H u m a n C h r o m o s o m e s : A M a n u a l o f B a s i c T e c h n i q u e s , P e r g a m o n P r e s s , N e w Y o r k C i t y , U S A）、フローソーティッド染色体調製（f l o w - s o r t e d c h r o m o s o m a l p r e p a r a t i o n s）、または酵母人工染色体（Y A C s）、細菌人工染色体（B A C s）、細菌 P I 構築または単一染色体 c D N A ライブラリーのような人工染色体構築が含まれる。

【0404】

染色体標品の i n s i t u ハイブリダイゼーション、および確定された染色体マーカーを用いる連鎖分析のような物理的マッピング技術は、遺伝子地図を拡張する場合に非常に貴重である。遺伝子地図の例は、S c i e n c e (1995; 270:410f およ 50

び 1994 ; 265 : 1981 f) に見出されうる。しばしば、特定のヒト染色体の数またはアームが知られていないとしても、別の哺乳動物種の染色体上の遺伝子の配置が、関連したマーカーを示すことがありうる。新しい配列は、物理的マッピングによって、染色体アームまたはその一部分に割り当てることができる。これは、ポジショナルクローニングまたは他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子について探索している研究者に貴重な情報を提供する。毛細管拡張性運動失調 (AT) などの疾患または症候群が、特定のゲノム領域への遺伝子連鎖によって大まかに位置決定されると、例えば AT が 11q22-23 (Gatti et al, (1988), Nature, 336 : 577-580)、その領域へのいずれかの配列マッピングは、更なる研究のための関連遺伝子または調節遺伝子を呈するだろう。本発明のヌクレオチド配列は、正常個体、保持個体または罹患した個体の間で、転座、逆位等による染色体位置の相違を検出するのに用いることもできる。

【0405】

医薬

本発明は、更に、ヒト SEP 活性のための処置を必要としている個体を処置するための医薬組成物であって、この活性に（阻害するまたは選択的に阻害するなどの）影響を与える試剤の治療的有効量および薬学的に許容しうる担体、希釈剤または賦形剤を含む組成物を提供する。

【0406】

したがって、本発明は、更に、本発明の試剤（本発明のヌクレオチド配列の発現パターンまたはその発現産物の活性をモジュレートすることができる試剤および／または本発明による検定によって識別される試剤）を含む医薬組成物を包含する。この点で、具体的にはヒト療法について、本発明の試剤は単独で投与することができるにもかかわらず、それらは、概して、予定の投与経路および標準的な医薬慣例に関して選択される医薬担体、賦形剤または希釈剤との混合物で投与されるであろう。

【0407】

例として、本発明の医薬組成物中では、本発明の試剤を、いずれか適当な 1 種類または複数の結合剤、1 種類または複数の滑沢剤、1 種類または複数の懸濁化剤、1 種類または複数のコーティング剤、または 1 種類または複数の可溶化剤と混合してよい。

【0408】

概して、本発明の試剤の治療的に有効な 1 日の経口または静脈内用量は、0.01 ~ 50 mg / kg（処置される対象の体重）、好ましくは、0.01 ~ 20 mg / kg、より好ましくは、0.1 ~ 20 mg / kg の範囲であると考えられる。本発明の試剤は、静脈内注入によって、0.001 ~ 10 mg / kg / 時の範囲であると考えられる用量で投与されてもよい。

【0409】

したがって、本発明は、ヒト SEP 活性のための処置を必要としている個体を処置する方法であって、この個体に有効量の本発明の医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0410】

典型的には、医師が、個々の患者に最も適している実際用量を決定するであろうが、それは、具体的な患者の年齢、体重、性別および応答により異なるであろう。上の投薬量は、平均的な場合を代表するものである。当然ながら、より高いまたはより低い投薬量範囲が望ましい個々の場合がありうるし、そのようなものは本発明の範囲内である。

【0411】

適当な場合、これら医薬組成物は、吸入によって；坐剤または膣坐剤の形で；局所には、ローション剤、液剤、クリーム剤、軟膏剤または散布剤の形で；皮膚パッチの使用によって；経口には、デンプンまたはラクトースのような賦形剤を含有する錠剤の形で；または単独でかまたは賦形剤との混合物でのカプセル剤または小卵剤で；または着香剤または着色剤を含有するエリキシル剤、液剤または懸濁剤の形で投与することができるし、または

それらは、非経口によって、例えば、空洞内、静脈内、筋肉内または皮下に注射することができる。非経口投与には、これら組成物は、他の物質、例えば、その溶液を血液と等張にさせる十分な塩類または単糖類を含有してよい滅菌水性液剤の形で最もよく用いることができる。口腔または舌下投与には、これら組成物は、慣用法で製剤化することができる錠剤または口中錠の形で投与してよい。

【0412】

対象（患者など）への経口、非経口、口腔および舌下投与について、本発明の試剤の1日投薬レベルは、典型的には、10～500mg（1回または分割用量で）であってよい。したがって、および例として、錠剤またはカプセル剤は、適宜、単回で、または一度に2個またはそれを越えて投与するのに、5～100mgの活性成分を含有してよい。本発明の試剤を徐放性製剤中で投与することも可能である。 10

【0413】

ある用途には、概して、ヒトの場合、本発明の試剤の経口投与が好ましい経路であり、最も好都合であり、いくつかの場合には、空洞内（i. c.）投与に関連するような他の投与経路に関連した欠点を回避することができる。レシピエントが、嚥下障害または経口投与後の薬物吸収の欠陥を患っている状況では、薬物を非経口投与してよい。

【0414】

獣医学的使用について、本発明の試剤は、典型的に、通常の獣医学慣例にしたがって適当に許容しうる製剤として投与され、そして獣医外科医が、具体的な動物に最も適当である投薬計画および投与経路を決定するであろう。しかしながら、ヒト処置の場合と同様、獣医学的処置のために試剤を単独で投与することは可能でありうる。 20

【0415】

典型的に、これら医薬組成物は、ヒトまたは動物使用のためであってよく、いずれか1種類またはそれを越える薬学的に許容しうる希釈剤、担体または賦形剤を含むであろう。医薬担体、賦形剤または希釈剤の選択肢は、予定の投与経路および標準的な医薬慣例に関して選択することができる。上に示されたように、これら医薬組成物は、担体、賦形剤または希釈剤として、またはそれに加えて、いずれか適当な1種類または複数の結合剤、1種類または複数の滑沢剤、1種類または複数の懸濁化剤、1種類または複数のコーティング剤、または1種類または複数の可溶化剤を含んでよい。

【0416】

本発明のいくつかの態様において、これら医薬組成物は、本発明の検定によってスクリーニングされた試剤；配列表または図に示される配列であって、その誘導体、フラグメント、ホモログまたは変異体を含めたもの、または配列番号：1または配列番号：5に示されるヌクレオチド配列にハイブリッド形成することができる配列のいずれか一つと相互作用することができる試剤の内の一つまたはそれを越えるものを含むであろう。 30

【0417】

本発明の範囲内に含まれるのは、ヒトSEPMRNAを不安定にするように機能するまたはヒトSEPの翻訳を阻害するオリゴヌクレオチド配列、アンチセンスRNAおよびDNA分子、およびリボザイムである。このようなヌクレオチド配列は、生物活性ペプチドのレベルを増加させることが好ましいと考えられる状態で用いることができる。 40

【0418】

ヒトSEPアンチセンス分子は、例えば、増加したヒトSEP活性に関係した種々の異常な状態の予防および／または処置のための基準を提供することができる。

【0419】

ヒトSEP核酸アンチセンス分子は、生物活性ペプチドレベルを上昇させることが好ましいと考えられる状態においてヒトSEPの活性を阻止するのに用いることができる。

【0420】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスまたはワクシニアウイルスに由来するまたは種々の細菌プラスミドに由来する発現ベクターは、標的細胞集団への組換えヒトSEPセンスまたはアンチセンス分子の送達に用いることができる。当業者に周知である方法を用 50

いて、ヒトSEPを含有する組換えベクターを構築することができる。或いは、組換えヒトSEPを、リボソームで標的細胞に送達することができる。

【0421】

完全長cDNA配列および／またはその調節成分は、研究者が遺伝子機能のセンス (Yousoufian Hand HF Lodish, (1993), Mol. Cell Biol., 13:98-104) またはアンチセンス (Eguchi et al, (1991), Annual Rev. Biochem., 60:631-652) 研究においてヒトSEPを手段として用いることを可能にする。ゲノムDNAから得られるcDNAまたは制御配列から設計されるオリゴヌクレオチドは、*in vitro* または *in vivo* で発現を阻害するのに用いることができる。このような技法は、現在、
10 当該技術分野において周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはより大きいフラグメントを、コーディング領域または制御領域に沿ったいろいろな位置から設計することができる。適当なオリゴヌクレオチドは、20ヌクレオチドの長さでありうるが、これを用いて、ヒトSEP配列または密接に関係した分子をヒトライブラリーから単離することができる。

【0422】

更に、ヒトSEP発現は、エンドペプチダーゼ活性を阻止することによって生物活性ペプチドレベルを増加させることが好ましいと考えられる状態において、高レベルのヒトSEPフラグメントを発現する発現ベクターで細胞または組織をトランスフェクションすることによってモジュレートすることができる。このような構築物は、翻訳できないセンスまたはアンチセンス配列を含む細胞を溢れさせることがありうる。DNA中への組込みが不
20 存在の場合でも、このようなベクターは、そのベクターの全コピーが内因性ヌクレアーゼによって無能力にされるまで、RNA分子を転写し続けることがありうる。このような一過性発現は、非複製性ベクターについては1ヶ月またはそれを越える間、および適当な複製要素がそのベクター系の一部分である場合はなお一層長い間持続することがありうる。

【0423】

ヒトSEPは、生物活性ペプチド活性を調節することおよび／または生物学的に不活性なペプチドのそれらの活性型へのタンパク質分解に関与しうるので、上記の“生物活性ペプチド(類)” (および同種のもの) への言及は、これら言及が必要な変更を加えて解釈するためにある場合について、適宜、“生物学的に不活性なペプチド(類)” (および同種
30 のもの) への言及を意味するとみなすこともできる。例えば、ヒトSEP活性の阻害が、増加したレベルの生物活性ペプチド(類) をもたらすかもしれない場合、このような阻害は、更に、または代わりに、増加したレベルの生物学的に不活性なペプチド(類) をもたらし、それによって、それらの“活性型”のペプチド(類)の減少したレベルをもたらすかもしれない。

【0424】

遺伝子発現の修飾は、プロモーター、エンハンサーおよびイントロンのような、ヒトSEP遺伝子の制御領域へのアンチセンス配列を設計することによって得ることができる。

【0425】

転写開始部位、例えば、リーダー配列の-10~+10の領域に由来するオリゴヌクレオチドが好適である。アンチセンスRNAおよびDNA分子は、転写物がリボソームに結合
40 するのを妨げることによってmRNAの翻訳を阻止するように設計することもできる。同様に、阻害は、“三重らせん”塩基対合としても知られる Hogeboom 塩基対合法を用いて行うことができる。三重らせん対合は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために充分に開く二重らせんの能力に影響する。

【0426】

したがって、本発明は、本発明の試剤 (またはその薬学的に許容しうる塩またはその薬学的に許容しうる溶媒和化合物さえも) を薬学的に許容しうる希釈剤、賦形剤または担体と一緒に含む医薬組成物を提供する。

【0427】

この医薬組成物は、獣医学的（すなわち、動物）使用またはヒト使用のためでありうる。したがって、本発明は、更に、ヒトSEPタンパク質（アンチセンス核酸配列を含めた）の阻害剤またはアンタゴニストの有効量を、薬学的に許容しうる希釈剤、担体または賦形剤（それらの組合せを含めた）との混合物で含む医薬組成物に関する。

【0428】

本発明は、また更に、医薬組成物であって、ヒトSEPポリヌクレオチド配列、ヒトSEPアンチセンス分子、ヒトSEPポリペプチド、タンパク質、ペプチド、または阻害剤、選択的阻害剤、アンタゴニスト（抗体を含めた）またはアゴニストのようなヒトSEP活性の有機モジュレーターの全部または一部分を単独で、または安定化用化合物のような少なくとも1種類の他の試剤との組合せで含んでよく、しかも生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロースおよび水が含まれるがこれに制限されないいずれかの滅菌の生体適合性医薬担体中で投与されてよい医薬組成物に関する。

10

【0429】

医薬組合せ

本発明の医薬組成物は、サイクリックGMPの増強剤またはエンハンサー（ホスホジエステラーゼ5型阻害剤、例えば、Sildenafil、または酸化窒素ドナー、または酸化窒素前駆体、例えば、L-アルギニナーゼなど）および／または中枢作用性製剤（例えば、アポモルフィンまたはメラノタンII（melanotan II）のようなドーパミンレセプターアゴニストまたはメラノコルチン（melanocortin）レセプターアゴニスト）などの1種類またはそれを越える他の薬学的活性剤と組み合わせて用いてよい。アポモルフィンの製剤としての使用についての教示は、US-A-5945117号に見出されうる。その具体的な文書において、アポモルフィンは舌下に送達される。

20

【0430】

更に、または代わりに、本発明の医薬組成物は、1種類またはそれを越える中性エンドペプチダーゼ（NEP）阻害剤（NEPi）、1種類またはそれを越えるPDE5阻害剤（PDE5i）（例えば、シルденаフィル（sildenafil）（Pfizer）、バルденаフィル（vardenafil）（Bayer BA38-9456）およびIC351（Cialis, Icos Lilly））、1種類またはそれを越えるNPYレセプターアンタゴニスト、1種類またはそれを越えるPDE2型阻害剤、1種類またはそれを越える酸化窒素（NO）ドナー（例えば、NMI-921）、1種類またはそれを越えるドーパミンレセプターアゴニスト（例えば、アポモルフィン、Uprima、Ixsene）、1種類またはそれを越えるメラノコルチンレセプターアゴニスト（例えば、Melanotan IIまたはPT14）、1種類またはそれを越えるカリウムチャンネルオープナー（例えば、K_{ATP}チャンネルオープナー（例えば、ミノキシジル、ニコランジル（nicorandil））および／またはカルシウム活性化カリウムチャンネルオープナー（例えば、BMS-204352））、1種類またはそれを越えるα1-アドレノセプターアンタゴニスト（例えば、フェントラミン、Vasofem、Vasomax）、1種類またはそれを越えるVIPレセプターアゴニストまたはVIP類似体（例えば、Ro-125-1533）またはVIPフラグメント、1種類またはそれを越えるα-アドレノセプターアンタゴニストとVIPの組合せ（例えば、Invicorp、Aviptadil）、1種類またはそれを越えるα2-アドレノセプターアンタゴニスト（例えば、ヨヒンビン）、1種類またはそれを越えるエストロゲン、エストロゲンおよびメドロキシプロゲステロンまたは酢酸メドロキシプロゲステロン（MPA）、またはエストロゲンおよびメチルテストステロンホルモン置換療法薬（例えば、HRT、特に、Premarin、Cenestin、Oestrofeminal、Equin、Estrace、Estrofem、Elleste、Solo、Estring、Estraderm、Estraderm TTS、Estraderm Matrix、Dermestril、Premphase、Prempro、Prempak、Premique、Estratest、Estratest HS、Tibolone）、1種類またはそれを越えるテストステロン置換薬（DHEA（デヒドロアンドロステンジオン）、テ

30

40

50

ストステロン (T o s t r e l l e) またはテストステロンインプラント (O r g a n o n) を含めた)、1 種類またはそれを越えるテストステロン／エストラジオール薬、1 種類またはそれを越えるエストロゲンアゴニスト (例えば、L a s o f o x i f e n e)、1 種類またはそれを越えるセロトニンレセプターアゴニストまたはアンタゴニスト (例えば、5 H T_{1 A}、5 H T_{2 C}、5 H T_{2 A} および 5 H T₃ レセプターアゴニストおよびアンタゴニスト; W O 0 0 / 2 8 9 9 3 号に記載の)、1 種類またはそれを越えるプロスタノイドレセプターアゴニスト (例えば、M u s e、アルプロスタジル、ミソプロストール)、1 種類またはそれを越えるプリン作動性レセプターアゴニスト (特に、P 2 Y 2 および P 2 Y 4)、または 1 種類またはそれを越える抗うつ薬 (例えば、ビュープロピオン (W e l l b u t r i n)、ミラタザピン (m i r r a t a z a p i n e)、ネファゾドン (n e f a z o d o n e)) と組み合わせて用いてよい。 10

【0431】

好ましくは、上記のこのような組合せで用いられる本発明のこの医薬組成物は、S E P i である。本発明の好ましい組合せは、S E P i + N E P i および S E P i + P D E 5 i、具体的には、S E P i + S i l d e n a f i l である。

【0432】

一般的な方法の参照

概して、本明細書中に述べられる技術は、当該技術分野において周知であるが、具体的には、S a m b r o o k e t a l. , M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l (1989) および A u s u b e l e t a l. , S h o r t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y (1990) 4th E d, J o h n W i l e y & S o n s , I n c. を参照してよい。P C R は、U S - A - 4 6 8 3 1 9 5 号、U S - A - 4 8 0 0 1 9 5 号および U S - A - 4 9 6 5 1 8 8 号に記載されている。 20

【0433】

寄託

次の試料は、ブダペスト条約にしたがって、承認された受託者 T h e N a t i o n a l C o l l e c t i o n s o f I n d u s t r i a l , F o o d a n d M a r i n e B a c t e r i a (N C I M B) a t 2 3 S t. M a c h a r D r i v e , A b e r d e e n , S c o t l a n d , A B 2 4 3 R Y , U n i t e d K i n g d o m に 30、2001年6月29日に寄託された。

【0434】

N C I M B 番号 N C I M B 4 1 1 1 0 は、E . c o l i M S S E 8 2 である。

寄託者は、P f i z e r L i m i t e d , R a m s g a t e R o a d , S a n d w i c h , K e n t , C T 1 3 9 N J , U n i t e d K i n g d o m であった。

【0435】

当業者は、上述の E . c o l i クローン (N C I M B 4 1 1 1 0) を、アンピシリンを含有する L u r i a B r o t h 中で容易に成長させ、そのクローンのプラスミド D N A を、S a m b r o o k , e t a l. , e d s. (1989) M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , N e w Y o r k , N Y , U S A に記載のアルカリ溶解法を用いて単離しうる。次に、S a n g e r e t a l. (P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e (U S A) , (D e c. 1 9 7 7) , 7 4 (12) : 5 4 6 3 - 5 4 6 7) によって記載され且つ蛍光検出について A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A , U S A (A p p l i e d B i o s y s t e m s 製造者の参考文献を参照されたい) によって変更されたようなジデオキシターミネーション法を用いて、その D N A を配列決定し且つヒト S E P を識別しうる。 40

【0436】

受託番号 N C I M B 4 1 1 1 0 として寄託された上述の寄託生物物質を言及する場合に本 50

明細書中で用いられる一つまたは複数の“細胞”という用語は、一つまたは複数の“微生物”または“細菌”という均等な用語と同じ意味である。

【0437】

本発明は、更に、その寄託物から誘導可能なおよび／または発現可能な配列およびそれを含む態様を包含する。本発明は、更に、その寄託物から誘導可能なおよび／または発現可能な部分配列およびそれを含む態様を包含するが、ここにおいて、それら部分配列は、活性ポリペプチド（活性酵素部位）をコードする。本発明は、更に、その寄託物から誘導可能なおよび／または発現可能な配列を含むタンパク質およびそれを含む態様を包含する。本発明は、更に、その寄託物から誘導可能なおよび／または発現可能な部分配列を含むタンパク質およびそれを含む態様を包含するが、ここにおいて、それら部分配列は、活性ポリペプチド（活性酵素部位）をコードする。

10

【0438】

実施例部分、図面および配列表への序論

本発明を、ここで、単に例として、添付の図面および配列表に関して記載する。

【0439】

【実施例】

実施例部分

実施例1－ヒトSE Pの同定

データベースマイニング

ヒトSE Pの新規な遺伝子は、プローブとしてネプリリシンタンパク質およびBLASTアルゴリズムを用いてヒト発現配列タグ（ESTs）のデータベースをマイニングすることによって発見した。次に、ESTヒット（データベース＝Inc y t e G o l dTM；遺伝子id.＝241161）を集合させて、コーディング配列の大きいフラグメントが予想される隣接した配列にした。これは、ネプリリシンタンパク質配列との相同性（60％同一性）によって触媒ドメインに該当する。PCRクローニングのためのプローブは、新規な遺伝子について予想されるコーディング配列のこの領域を用いて設計した。次に、ヒトゲノムデータベースからの未完成の配列を更にマイニングすることで、5個の予想されるエクソンを識別し、これらは、欠けているN末端領域中の同じ新規な遺伝子に属すると仮定された。これは、後に、ヒト精巣ライブラリーから得られる完全長クローンの配列決定後に確認した（下を参照されたい）。

20

30

【0440】

新規なヒトSE P配列には、3'UTR、および二つの活性触媒部位の一つを含有するヒトSE Pの高度に保存されたC末端領域中のコーディング配列の一部が含まれる。この新規なヒトSE Pは、37アミノ酸のインサートを含有すると考えられる。

【0441】

完全長ヒトSE P cDNAの単離

オリゴヌクレオチド（5'－c t g t c t t g a t g g a t t g g a t g－3'）は、5'－RACE（5' cDNA末端の迅速増幅）PCRを用いて、cDNAライブラリーからより長いヒトSE P cDNAを増幅させることができるように隣接した発現配列タグ（ESTs）の上述の集合からの部分ヒトSE P cDNA配列を用いて設計した。

40

【0442】

次に、12アレイの96ウェルフォーマットヒト Rapid－ScreenTM cDNAライブラリーのパネルを、5'－RACE PCRによってスクリーニングした。ヒトSE Pに該当するcDNAを、脳、肝、胎盤、小腸および精巣に由来するライブラリー中で識別した。

【0443】

これらcDNAには、完全長であるものがなかったので、精巣からのそれより長いが部分長のcDNAの内の一つの配列から設計されたプライマー（5'－g t c c t t g g c a g t c g a a t t c t c c－3'）を用いてライブラリーのパネルについて更に5'－RACEを行った。これは、単離され且つ両末端から配列決定された精巣ライブラリー中の

50

より長い（約 3.0 kb）推定上の完全長 cDNA クローンを識別した。この完全長ヒト SEP クローンを MSSE82 と称し（そして NCIMB に受託番号 NCIMB41110 として寄託し）、この完全長クローンを、Genbank 受託番号 #AF067196 を有する pCMV6-XL4 ベクター中にクローン化した。

【0444】

実施例 2－ヒト SEP mRNA の組織分布

多重組織メッセンジャー RNA ブロットを、ヒト SEP についてプローブした。SEP mRNA は、精巣試料中で検出されたが、他の組織では検出されなかった。

【0445】

完全なヒト SEP コーディング配列に該当する DNA のフラグメントを、PCR により、SEP クローン MSSE82 を鋳型として用いて増幅させた。そのフラグメントを、メガプライムキット（Amersham PLC, UK）を用いて ^{32}P -dCTP で放射性標識した。その放射性標識されたフラグメントをハイブリダイゼーションプローブとして、いろいろなヒト組織および細胞系の選択（76）から、mRNA を含有する多重組織 mRNA アレイ（ドットブロット）（Clontech, USA より）をスクリーニングするのに用いた。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、そのブロットにオートラジオグラフィを施した。精巣からはシグナルを検出したが、他の組織からは検出されなかった。

【0446】

実施例 3－組換え SEP 酵素の製造

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の培養物を、リポフェクタミン（lipofectamine）試薬プロトコール（Invitrogen Ltd, Paisley, UK）に記載のリポフェクタミン法を用いて、プラスミド MSSE82 でトランスフェクションする。トランスフェクション後 24 時間または 48 時間に、細胞培地を採取し、そして 3000g で 5 分間の遠心分離によって細胞破片を除去する。次に、その培地を、50mM HEPES pH7.4 / 10% グリセロールに対して、“スライド・アライサー（slide a lyser）”（Pierce and Warner, Chester UK より）を用いて 4℃ で一晚透析する。次に、透析された試料をアリコートで凍結させ、液体窒素下で貯蔵する。

【0447】

実施例 4－SEP ペプチダーゼ活性の検定

SEP 検定

背景

SEP 検定は、NEP と一緒にの使用について、Carvalho et al. によって開発された FRET 検定に基づく（Carvalho et al., Annal. Biochem. 237, pp. 167-173 (1996)）。この SEP FRET 検定は、蛍光原性ドナー／アクセプター色素の新規な組合せ、具体的には、ローダミンググリーン（Molecular Probes, Inc.）および QSY7（Molecular Probes, Inc.）を代用することを除いて、同一ではないが類似した分子内消光蛍光原性ペプチド基質を利用する。

【0448】

SEP のエンドペプチダーゼ活性は、合成ペプチド基質ローダミンググリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys (QSY7)-βAla-NH₂ をタンパク質分解するその能力をモニターすることによって測定する。

【0449】

この検定に選択される二つの発蛍光団（蛍光原性色素）は、オーバーラップする発光および吸収スペクトルを有し、したがって、エネルギー移動に適している。ローダミンググリーンは、ドナーとして作用し、485nm で励起した場合、535nm で発光（蛍光）を生じ、順次、QSY7 を励起する（FRET が起こっている）。その QSY7 は蛍光的に不活性しているので、535nm より上で発光を生じないし、したがって、シグナルは認め

10

20

30

40

50

られない（ローダミンググリーン発光が消光している）。

【0450】

このペプチド基質のArg-V al ペプチド結合におけるSEPによる切断（選択的加水分解）時に、ローダミンググリーンおよびQSY7部分は別々に移動するので、485nmでの励起では、エネルギー移動はもはや生じることができない。結果として、蛍光の増加は、ローダミンググリーンについて535nmで認められる。

【0451】

合成ペプチド基質ローダミンググリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-V al-Cys (QSY7)-βAla-NH₂の製造

実験：

ペプチド組み立てを、0.25mmol FMOC-PAL-PEG-PS樹脂上で、固相ペプチド合成プロトコールにより、製造者に供給された（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）9-フルオレニルメトキシカルボニル（FMOC）基剤合成サイクルへの変更を用いて完成した。本発明者が変更したサイクルは、20%ピペリジン／N-メチルピロリジノン（NMP）での2x5分間処理でアミノ末端を脱保護し；その効率を、301nmでのUV吸光度により、UV吸光度検出器を介する小アリコートの脱保護溶液の通過によって監視する。別々のカートリッジ中で、入ってくるアミノ酸を、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中に溶解した各0.9当量の2-（1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸（HBTU）／1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）で活性化する。2当量のジイソプロピルエチルアミン（DIEA）を加える。同時に、樹脂を続いてNMPで洗浄して、脱保護副生成物を除去する。洗浄液を樹脂から排液させ、そして活性化したアミノ酸エステルを樹脂に移し、アミノ末端にカップリングさせるように20分間攪拌する。残留するカップリング溶液を排液し、樹脂を再度NMPで洗浄する。ペプチド均一性を確実にするために、NMP中の0.4M無水酢酸／0.04M HOBt溶液および12mmol DIEAを樹脂に加えて、いずれの潜在的な未反応部位もアセチル化する。最後に、樹脂をNMPで洗浄し、排液した後、1:1のジクロロメタン／2,2,2-トリフルオロエタノール混合物で洗浄し、排液する。これは、ペプチド合成の一つのサイクルの典型である。完成した合成用樹脂を、Reagent K（King, D. S. et al., (1990), Int. J. Pep. Prot. Res., 32, pp. 255-66）を用いて切断し且つ脱保護して、251mg（100%）の粗製ペプチドCP1、エレクトロスプレー質量分析（ERMS）（m/z計算値（calc.）=977.21（MH⁺ 平均），obs.=977.47）を与える。

【0452】

QSY-7のシステインへの連結：

50mg（51μmol）の粗製CP1を、45mg（52.4μmol）のQSY-7マレイミドを含有する10%DIEA／DMFの溶液中に溶解させた。10分後、その反応を、HPLC-MS分析によって不完全であると判定し、更に30mg（30.7μmol）の粗製ペプチドを加えた。更に30分後、HPLC-MSにより、その反応は完了していると判定し、出発試薬は全て消費した。生成物を、C18分取用HPLCクロマトグラフィーによって単離し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS）によって所望の生成物分子量を示す画分をプールし、凍結乾燥させて、73.7mg（50%）の紫色粉末、CP2、ESMS（m/z calc.=1797.86（MH⁺ 一同位体），obs.=1797.86）とした。

【0453】

ビス（トリフルオロアセチル）ローダミンググリーンのアミノ末端への連結：

73.7mg（41μmol）のCP2を、35mg（52.8μmol）のローダミンググリーンカルボン酸，トリフルオロアセトアミド，スクシンイミジルエステル（5（6）-CR 110TFA, SE）* 混合異性体* を含有する2%DIEA／DMF溶液中に

10

20

30

40

50

溶解させた。2時間後、HPLC-MS分析により、その反応は完了していると判定した。生成物を、C4分取用HPLCクロマトグラフィーによって単離し、所望の生成物分子量(MALDI-MS)を示す画分をプールし、凍結乾燥させて、71.4mg(74%)の紫色粉末CP3、E SMS(m/z calc. = 2345.92 (MH+ 一同位体), obs. = 2345.47)とした。

【0454】

ローダミンググリーンからのトリフルオロアセチル保護基の除去:

71.4mg(30.4μmol)のCP3を、10mlの4:1のCH₃CN/H₂O中に溶解させた。これに、200mg(1886μmol)のNa₂CO₃を加えた。16時間ボルテックスした後、上澄みを不溶性物質からデカントした。反応容器を1mlのDMSOですすぎ洗浄し;これを上澄みと一緒にし、そして生成物を、C4分取用HPLCクロマトグラフィーによって単離した。生成物分子量(MALDI-MS)を示す画分と一緒にし、凍結乾燥させて、64mg(98%)の紫色粉末CP4、E SMS(m/z calc. = 2155.54 (MH+ 平均), obs. = 2155.27)とした。CP4は、所望の合成ペプチド基質ローダミンググリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)-βAla-NH₂である。

【0455】

物質:

試薬は全て、入手可能な最高の商用純度のものを購入し、そして更に精製することなく用いた。ペプチド合成のための試薬は全て、次のものを除いて、Applied Biosystems, Foster City, CA, USAから購入した。QSYTM-7マレイミド(カタログ番号Q-10257)およびローダミンググリーンカルボン酸、トリフルオロアセトアミド、スクシンイミジルエステル(5(6)-CR 110TFA, SE)*混合異性体*(カタログ番号R-6112)は、Molecular Probes, Inc., OR, USAから購入した;FMOC-PAL-PEG-PSは、Perseptive Biosystems, MA, USA(カタログ番号GEN913384)から購入した;FMOC-B-アラニンおよびFMOC-d-フェニルアラニンは、Novabiochem, CA, USAから購入した;FMOC-Arg(Pbf)-OHは、AnaSpec, Inc., CA, USAから購入した;2,2,2-トリフルオロエタノールは、Aldrich, WI, USAから購入した。炭酸ナトリウムは、Fisher, PA, USAから購入した。

【0456】

分取用HPLCクロマトグラフィーは、Vydac(CA, USA)C18(カタログ番号218TP1022)またはC4(カタログ番号214TP1022)カラム上において、10ml/分の流速で、0%~80%の直線勾配(A=5%CH₃CN/0.1%TFA/94.9%H₂O, B=100%CH₃CN)で30分間にわたって溶離して行って、30秒の時間画分を集めた。分析用HPLC-MSは、Waters(MA, USA)2690 HPLCインレットおよびWaters 996フォトダイオードアレイ検出器と連結されたMicromass(Manchester, UK)LC T質量分析計(外部校正される標準に基づく質量)を用いて、Vydac C4(カタログ番号214TP5415)カラム上における0%~80%の直線勾配(A=5%CH₃CN/0.1%TFA/94.9%H₂O, B=100%CH₃CN)で1ml/分の流速で30分間にわたるクロマトグラフィーを行って実施した。デコンボリューション分子量は、多重荷電実測イオンから、Micromass変換ソフトウェアを用いて計算した。MALDI-MSは、Perseptive Biosystems Voyager-DE リニア型質量分析計において、αシアノ4-ヒドロキシケイヒ酸マトリックス(Hewlett Packard, CA, USA)を用いて得て、報告した質量は外部校正に基づく。

【0457】

操作(化学構造を含む):

10

20

30

40

50

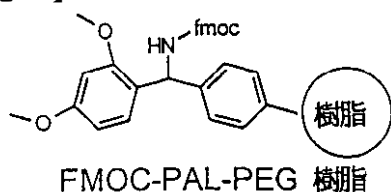
CP4 (= 合成ペプチド基質ローダミングリーン-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSYTM-7)-βAla-NH₂) を、鍵中間体 CP3 を固相ペプチド合成スキーム中に包含させることによって合成する。

【0458】

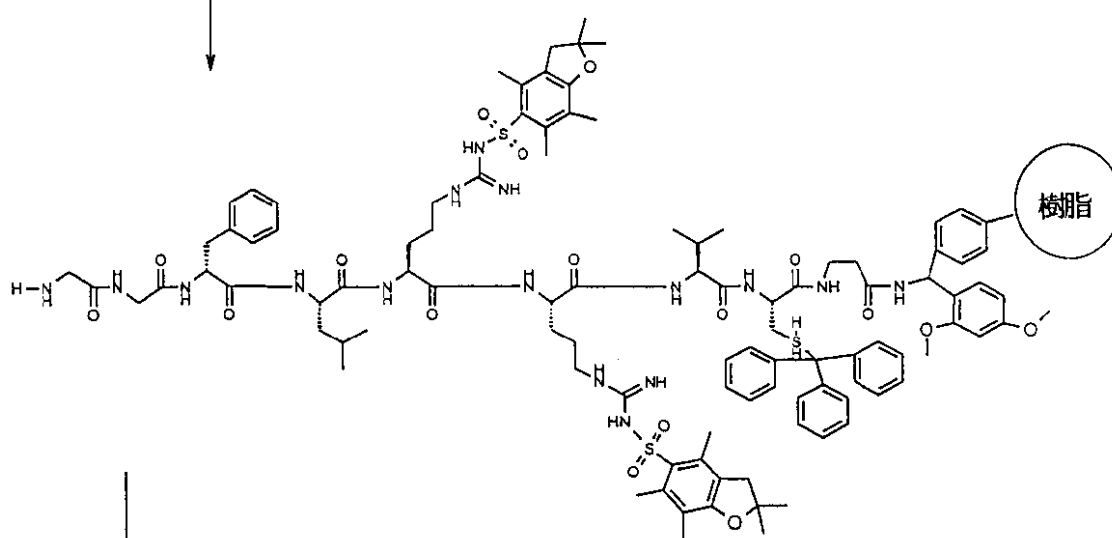
スキーム 1 :

【0459】

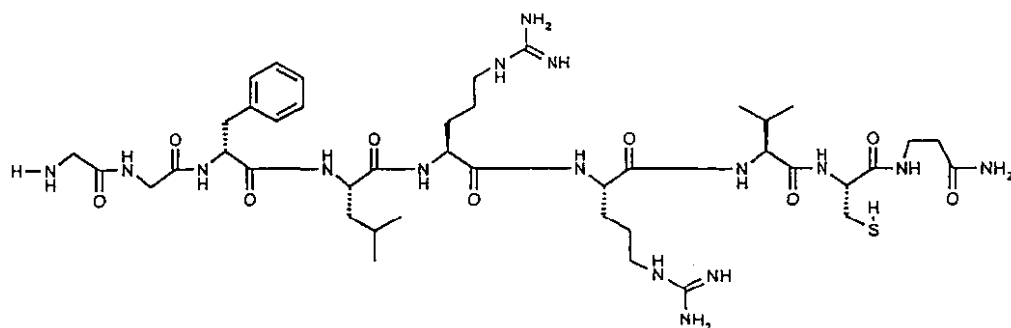
【化 1】



9 サイクルの固相ペプチド合成



樹脂切断および脱保護



CP1

要約すると、FMOC-PAL-PEG樹脂を、収率および時間の効率について最適化される固相ペプチド合成プロトコルを用いて作り上げる。これらサイクル（上記に十分な詳細）は、2回のFMOC脱保護、洗浄、HBTUで活性化したアミノ酸の1回のカップリング、洗浄、キャッピング、そして最後に、初めはNMPで、次に1：1のトリフルオロエタノール／ジクロロメタンでの洗浄を包含する。これら洗浄は、樹脂二次構造を弛緩させるのを助けて、次のサイクル中に次の入ってくるアミノ酸の完全な脱保護および有効

10

20

30

40

50

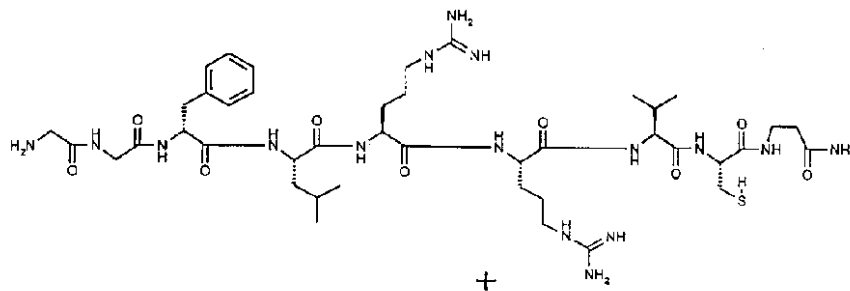
なカップリングを可能にする。

【0460】

CP2を、スキーム2にしたがって合成する（上記に十分な詳細）：

【0461】

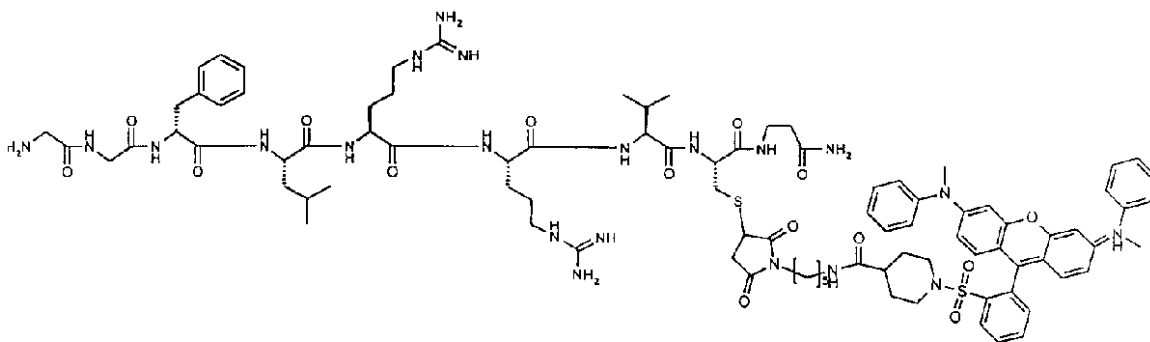
【化2】



10



20



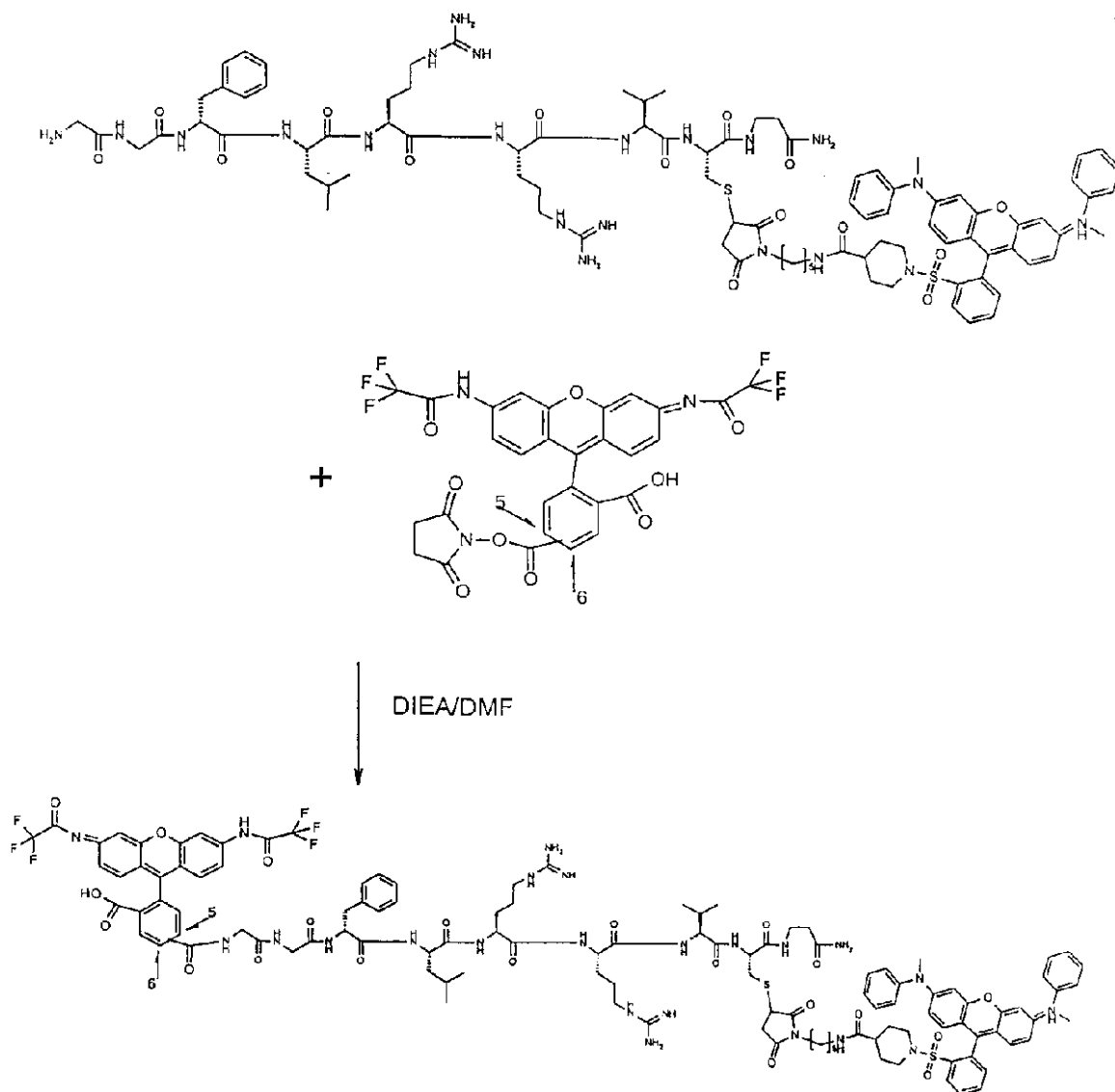
30

CP2

このQSY-7タグの包含後、スキーム3にしたがって、二番目の発蛍光団であるローダミングリーンを、ピストリフルオロアセチル保護された色素として加える：

【0462】

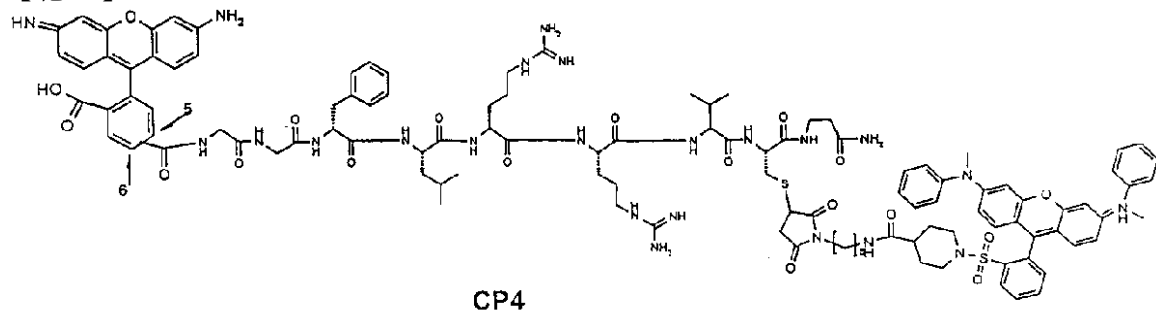
【化3】



最後に、トリフルオロアセチル基を、 Na_2CO_3 での処理によって除去して、所望の基質 CP4 を与える：

【0463】

【化4】



検定

検定用の試薬は、最初に、次のように調製する：

基質溶液は、基質ローダミングリン—Gly—Gly—dPhe—Leu—Arg—Arg—Val—Cys (QSY7)—βAla—NH₂ を 50 mM HEPES 緩衝液 pH 7.4 (Sigma, UK) 中に 2 μM の濃度で再懸濁させた後、25 ml につき 1 個の EDTA 不含プロテアーゼ阻害剤混合物錠剤 (Roche Diagnostics

10

20

30

40

50

, UK)を加えることによって調製する。

【0464】

上記のSEP酵素のアリコートを融解させた後、50mM HEPES、pH7.4中に、その50μlが、検定中に約30%の基質を生成物に変換するのに十分な酵素を含有するように、各々の酵素バッチに特異的な所定の因子によって希釈させる。

【0465】

4mlのDMSO+96mlの50mM HEPES pH7.4を含んで成る4%DMSOを調製する。

生成物溶液は、500μlの基質溶液を、250μlの酵素溶液+250μlの4%DMSO溶液に加え、そして37℃で16時間インキュベートすることによって調製する。

10

【0466】

検定を次のように設定する：

黒色96ウェル微量滴定プレート中において、100μlの基質溶液を50μlの4%DMSO溶液に加える。同様の非特異的バックグラウンドブランクも設定するが、ここにおいて、この50μlの4%DMSO溶液は、更に、40μMホスホルアミドンを含有する。50μlの酵素溶液をその検定およびブランクに加え、その96ウェルプレートをBMGギャラクシー蛍光リーダー中に入れて、BioLiseソフトウェアパッケージで操作する(BMG Lab technologies, Offenbergl, Germany)。

【0467】

20

そのプレートを、蛍光リーダー中において37℃で1時間インキュベートし、蛍光測定値を3分毎に得る(励起(Ex)485nm/発光(Em)535nm)。SEPのタンパク質分解活性は、試料の蛍光の増加速度から非特異的バックグラウンドブランクの蛍光単位の増加速度を差し引いたものに相当する。4回の成功した示数についてそのソフトウェアによって計算される最大速度測定値(MaxV)を、この計算に用いる。

【0468】

同一微量滴定プレート上のウェル中の200μlの生成物から得られる蛍光測定値を用いる。必要ならば、この値を、SEP検定の60分の時点から測定された蛍光単位と一緒に用いて、1時間のインキュベーション時間中にタンパク質分解される基質の百分率(%)を計算する、または測定された蛍光増加速度を、タンパク質分解された基質ng/分/ml(酵素)のような他の有用な単位に変換する。

30

【0469】

この検定を用いて、Butterworthsによって公表されたAthel Cornish Bowden, 1979によるFundamentals of Enzyme Kineticsに記載の標準的な原理にしたがって、VmaxおよびKmのような酵素反応速度論パラメーターを計算する。

【0470】

SEP阻害剤の阻害パラメーターを決定するためのSEP検定の使用

SEP阻害剤(例えば、ホスホルアミドン)のIC₅₀を決定するために、多重SEP検定を、上記のように、50μlのDMSO溶液(阻害剤の10mM100%DMSO原液の4%DMSO/50mM HEPES pH7.4を用いる適当な希釈によって作られる)中に含まれる一定範囲の試験濃度の阻害剤で行う。適当な標準グラフフィッティング計算機プログラムを用いて、S字形用量反応曲線を、対数阻害剤濃度に対するMaxV(または阻害%または活性%)のプロットに適合させる。IC₅₀は、50%の最大阻害を引き起こす阻害剤濃度として計算する。典型的には、ある与えられたIC₅₀決定値について、半対数単位増加量が異なる一定用量範囲の少なくとも10種類の阻害剤濃度を用いる。

40

【0471】

この検定を用いて、例えば、Butterworthsによって公表されたAthel Cornish Bowden, 1979によるFundamentals of E

50

n z y m e K i n e t i c s に記載の標準的な酵素学原理にしたがって、阻害のK i およびモード（すなわち、この阻害が競合的、混合、非競合的であるかどうか等）を決定する。

【0472】

実施例5－性的興奮の動物モデル

本研究において、本発明者は、男性および女性の性的興奮の生理学についての強壮な再現可能モデルを開発した。このモデルは、麻酔されたウサギを用い、L a s e r D o p p l e r 技法を用いて空洞内血圧および性器血流を監視し、同時に、心臓血管パラメーターを常套的に記録する。本発明者は、試験薬の不存在下および存在下における骨盤神経刺激またはV I Pの注入によって引き起こされる陰茎中の空洞内血圧および膣（および陰核 10

【0473】

本発明者は、この動物モデルが、臨床データに直接的に反映すると考えている。したがって、このモデルを用いて、空洞内血圧の増加による陰茎勃起の増進および膣または陰核血流増進を測定するなどの、M E DおよびF S A Dの予防および／または処置のための候補薬を研究することができる。

【0474】

男性および女性の性的興奮に関与する潜在的物質としてV I Pおよび他の神経ペプチドを識別すること

血管作用性腸管ペプチド（V I P）として知られる前性的（p r o - s e x u a l）神経ペプチドを分解するS E Pの能力を、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）であって、P e n i n s u l a L a b o r a t o r i e s , C A , U S A から商業的に入手できるV I P R I Aなどを利用することによって測定する。 20

【0475】

S E P酵素試料、典型的には、5～100 μ lの組換えS E P（上記の方法によって製造される）を、V I Pペプチド試料、典型的には、1～10 n gと一緒に、50 m M H E P E S , p H 7 . 4のような緩衝液中において37℃で5時間インキュベートする。これと同一であるが10 μ Mホスホルアミドンも含有する負の対照を設定し、同一に処理する。インキュベーション時間後、試料および負の対照双方に残っているV I Pの量を、製造者の取扱説明書によりR I Aを用いて決定する。負の対照に対する試料中のV I P量の減少は、S E PのV I Pタンパク質分解活性の尺度である。この検定を用いて、例えば、B u t t e r w o r t h s によって公表された A t h e l C o r n i s h B o w d e n , 1979 による F u n d a m e n t a l s o f E n z y m e K i n e t i c s に記載の標準的な原理にしたがって、V m a xおよびK mのような酵素反応速度論パラメーターを決定する。 30

【0476】

実施例6－S E P阻害剤についての動物試験法

女性性的機能不全動物モデル

麻酔プロトコール

雌ニュージーランドウサギ（～2.5 k g）に、M e d e t o m i d i n e（D o m i t o r（登録商標））0.5 m l / k g 筋肉内（i . m .）および K e t a m i n e（V e t a l a r（登録商標））0.25 m l / k g 筋肉内（i . m .）の組合せを前投与し、同時に、フェイスマスクによる吸入酸素を維持する。これらウサギを、ベンチレーターに連結された P o r t e x ^{T M} カフなし気管内チューブ3 I Dを用いて気管切開し、そして30～40呼吸／分の換気速度において、18～20 m lのおよその一回呼吸量および10 c m H₂ Oの最大気道圧で維持する。次に、麻酔薬を I s o f l u r a n e に切り替え、2 l / 分でのO₂で換気を続ける。右耳辺縁静脈に、23 Gまたは24 Gカテーテルを用いてカニューレ挿入し、乳酸加リンガー液を0.5 m l / 分で灌流させる。このウサギを、侵襲性手術中は3% I s o f l u r a n e で維持し、維持麻酔には2%に降下させる。 40

【0477】

血管のカニューレ挿入

ウサギの左鼠けい部を剃毛し、垂直切開を大腿に沿って約5cmの長さで行う。大腿静脈を露出させ、分離後、薬物および化合物の注入用にPVCカテーテル(17G; Portex Limited, Hythe, Kent, UK)をカニューレ挿入する。カニューレ挿入を大腿動脈について繰り返し、カテーテルを10cmの深さまで挿入して、カテーテルが腹大動脈に確実に達するようにする。この動脈カテーテルをGouldシステムに連結して、血圧を記録する。血液ガス分析のための試料も、この動脈カテーテルによって採取する。収縮期および拡張期血圧を測定し、そして式 $[(\text{拡張期} \times 2 + \text{収縮期}) \div 3]$ を用いて平均動脈血圧を計算する。心拍数は、脈波型酸素飽和度計およびPonemahデータ捕捉ソフトウェアシステム(Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc., OH, USA)を用いて測定する。

10

【0478】

骨盤神経の刺激

腹部正中切開を腹腔中に行う。この切開は、恥骨直上約5cmの長さである。脂肪および筋肉を大まかに切除して、体腔の下に走る下腹神経を露出させる。恥骨の上にある大腿静脈および動脈を損傷させないために、恥骨壁の側湾曲に近い状態を保つことが不可欠である。坐骨神経および骨盤神経は、より深部にあり、ウサギの背側に更に切開後に見出される。坐骨神経がいったん識別されると、骨盤神経は容易に見出される。骨盤神経という用語は、大まかに用いられており；これについての解剖学書では、これら神経を十分に詳細に定義することができない。しかしながら、この神経の刺激は、膣および陰核の血流の増加および骨盤領域の神経支配を引き起こす。この骨盤神経を周囲組織から分離し、Harvard双極刺激電極をその神経のまわりに置く。この神経を、ある程度の引っ張りを与えるように僅かに持ち上げた後、電極を適所に確保する。約1mlの軽パラフィン油をその神経および電極のまわりに置く。これは、神経への保護潤滑剤として作用し且つ電極の血液混入を防止する。電極をGrass S88 Stimulatorにつなぐ。骨盤神経を、次のパラメーター、すなわち、5V、0.5msパルス幅、10秒の刺激持続および2~16Hzの周波数範囲、を用いて刺激する。再現性応答は、神経を15~20分毎に刺激した場合に得られる。

20

30

【0479】

周波数応答曲線を、亜最大下応答として用いる最適周波数を決定するために、各実験の開始時に決定し、通常は4Hzである。試験される1種類または複数の化合物を、大腿静脈により、Harvard 22注入ポンプを用いて注入して、連続15分刺激サイクルを可能にする。

【0480】

Laser Doppler 探針の配置

腹部正中切開を骨盤の尾側末端に行って、骨盤部位を露出させる。結合組織を除去して、陰核膜を露出させ、その壁が小血管から確実に離れているようにする。外部陰核壁も、結合組織を全て除去することによって露出させる。一つのLaser Dopplerフロー探針を膣内に3cm挿入するので、探針シャフトの半分はまだ見えている。第二探針は、外部陰核壁直上にあるように配置する。次に、これら探針の位置を、シグナルが得られるまで調整する。第二探針を外部陰核壁上の血管表面直上に置く。両方の探針を適所にクランプで固定する。

40

【0481】

膣および陰核の血流を、Ponemahデータ捕捉ソフトウェア(Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.)を用いてFlowmeterから直接的に数値としてか、またはGouldチャートレコーダートレースから間接的に記録する。校正は実験開始時に設定する(0~125ml/分/100g組織)。

50

【0482】

血管作用性腸管ペプチド (VIP) の注入

注入されるVIP (Bachem, H-3775) の用量は、2.0、6.0、20.0、60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 静脈内 (i. v.) であり、0.5 ml 容量の生理食塩水中で注入する。VIPは、三方タップによって大腿静脈中に500 $\mu\text{l}/\text{分}$ で注入する Harvard 22ポンプを用いて注入する。VIP注入後、カテーテルをヘパリン加生理食塩水 (Hepsaline) で洗浄するので、カテーテル中にはVIPが残っていない。

【0483】

VIP注入を用いた実験には、再現性応答を得られるように最初の感作性用量反応曲線 (2~60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) のが必要である。Hepsaline (50 UI/ml) の最初の注入は、負の対照として作用するように注入する。 10

【0484】

阻害剤の注入

SEP阻害剤およびビヒクル対照は、VIPと同速度で注入する。SEP阻害剤は、VIP用量反応曲線の前の30分間放置し、骨盤神経刺激の前の15分間放置する。

【0485】

データは、平均性器 (腔/陰核) 血流土平均の標準誤差 (s. e. m.) として表す。有意の変化は、スチューデントt検定を用いて確認する。

男性性的機能不全動物モデル

20

ウサギ麻酔法

雄ニュージーランドウサギ (~2.5 kg) に、Medetomidine (Domitor (登録商標)) 0.5 ml/kg 筋肉内 (i. m.) および Ketamine (Vetalar (登録商標)) 0.25 ml/kg 筋肉内 (i. m.) の組合せを前投与し、同時に、フェイスマスクによる吸入酸素を維持する。これらウサギを、ベンチレーターに連結された PortexTM カフなし気管内チューブ3 IDを用いて気管切開し、そして30~40呼吸/分の換気速度において、18~20 mlのおよその一回呼吸量および10 cmH₂Oの最大気道圧で維持する。次に、麻酔薬を Isoflurane に切り替え、2 l/分でのO₂で換気を続ける。右耳辺縁静脈に、23 Gまたは24 Gカテーテルを用いてカニューレ挿入し、乳酸加リンガー液を0.5 ml/分で灌流させる。このウサギを、侵襲性手術中は3% Isoflurane で維持し、維持麻酔には2%に降下させる。 30

【0486】

血管のカニューレ挿入

ウサギの左鼠けい部を剃毛し、垂直切開を大腿に沿って約5 cmの長さで行う。大腿静脈を露出させ、分離後、薬物および化合物の注入用にPVCカテーテル (17 G; Portex Limited) をカニューレ挿入する。或いは、または更に、左頸静脈を露出させ、分離後、薬物および化合物の注入用にPVCカテーテル (17 G; Portex Limited) をカニューレ挿入する。カニューレ挿入を大腿動脈について繰り返し、カテーテルを10 cmの深さまで挿入して、カテーテルが腹大動脈に確実に達するようにする。この動脈カテーテルを Gould システムに連結して、血圧を記録する。血液ガス分析のための試料も、この動脈カテーテルによって採取する。収縮期および拡張期血圧を測定し、そして式 [(拡張期 x 2 + 収縮期) ÷ 3] を用いて平均動脈血圧を計算する。心拍数は、脈波型酸素飽和度計および Ponemah データ捕捉ソフトウェアシステム (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.) を用いて測定する。 40

【0487】

骨盤神経の刺激

腹部正中切開を腹腔中に行う。この切開は、恥骨直上約5 cmの長さである。脂肪および筋肉を大まかに切除して、体腔の下に走る下腹神経を露出させる。恥骨の上にある大腿静 50

脈および動脈を損傷させないために、恥骨壁の側彎曲に近い状態を保つことが不可欠である。坐骨神経および骨盤神経は、より深部にあり、ウサギの背側に更に切開後に見出される。坐骨神経がいったん識別されると、骨盤神経は容易に見出される。骨盤神経という用語は、大まかに用いられており；これについての解剖学書では、これら神経を十分に詳細に定義することができない。しかしながら、この神経の刺激は、空洞内血圧および空洞血流の増加および骨盤領域の神経支配を引き起こす。この骨盤神経を周囲組織から分離し、Harvard 双極刺激電極をその神経のまわりに置く。この神経を、ある程度の引っ張りを与えるように僅かに持ち上げた後、電極を適所に確保する。約 1 ml の軽パラフィン油をその神経および電極のまわりに置く。これは、神経への保護潤滑剤として作用し且つ電極の血液混入を防止する。電極を Grass S88 Stimulator につなぐ。骨盤神経を、次のパラメーター、すなわち、5 V、0.5 ms パルス幅、16 Hz の周波数で 20 秒の刺激持続を用いて刺激する。再現性応答は、神経を 15～20 分毎に刺激した場合に得られる。

10

【0488】

上のパラメーターを用いた数回の刺激を行って、平均対照応答を決定する。試験される 1 種類または複数の化合物を、頸静脈により、Harvard 22 注入ポンプを用いて注入して、連続 15 分刺激サイクルを可能にする。陰茎のまわりの皮膚および結合組織を除去して、陰茎を露出させる。カテーテルセット (Insyte-W, Becton-Dickinson 20 Gauge 1.1 x 48 mm, Becton-Dickinson) を、白膜を介して左海綿体腔中に挿入し、針を除去して、軟質カテーテルを残す。このカテーテルを、圧力変換器 (Ohmeda 5299-04) によって Gould システムに連結して、空洞内血圧を記録する。空洞内血圧がいったん決定されたら、そのカテーテルを、Vetbond (組織用接着剤, 3M) を用いて適所で密封する。心拍数は、脈波型酸素飽和度計および Ponomah データ捕捉ソフトウェアシステム (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.) を用いて測定する。

20

【0489】

空洞内血流は、Ponomah データ捕捉ソフトウェア (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.) を用いて Flowmeter から直接的に数値としてかまたは Gould チャートレコーダートレースから間接的に記録する。校正は実験開始時に設定する (0～125 ml / 分 / 100 g 組織)。

30

【0490】

阻害剤の注入

SEP 阻害剤およびビヒクル対照は、0.1 ml / 秒の速度で注入する。SEP 阻害剤は、骨盤神経刺激の前の 15 分間放置する。

【0491】

データは、平均空洞内血圧 $\pm$ s. e. m. として表す。有意の変化は、スチューデント t 検定を用いて確認する。

【0492】

【配列表】

【0493】

【表 3】

40

配列表

(説明の一部をなす)

配列番号 1

ヒトSEPをコードするヌクレオチド配列 (cDNA)

GGCACCAGCTCAGCCCCAAGCCACTGCTCTCCCATCCCAGTCCCTGGAAATCCAC
CCACTTGGCCCAGCTCACCCCAACTCCAACCCACTGGGACCCAGTCTCCAGGGGCCTGAC
TGTGGGCGGCAGCCACTCCTGAGTGAGCAAAGGTTCTCCGCGGTGCTCTCCCGTCCAGA
GCCCTGCTGATGGGGAAGTCCGAAGGCCCCGTGGGGATGGTGGAGAGCGCTGGCCGTGCA
GGGCAGAAGCGCCCCGGGTCTCTGGAGGGGGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGTGACC
GCTGCCCTGGTGGCCTTGGGTGTCTCTACGCCGACCCGACAGAGGGAAGCAGCTGCCACGC
CTTGCTAGCCGGCTGTGCTTCTTACAGGAGGAGAGGACCTTTGTAAAACGAAAACCCCGA
GGGATCCCAGAGGCCCAAGAGGTGAGCGAGGTCTGCACCACCCCTGGCTGCGTGATAGCA
GCTGCCAGGATCCTCCAGAACATGGACCCGACACCGGAACCGTGTGACGACTTCTACCAG
TTTGTCATGCGGAGGCTGGCTGCGGCGCCACGTGATCCCTGAGACCAACTCAAGATACAGC
ATCTTTGACGTCTCCGCGACGAGCTGGAGGTATCTCAAAGCGGTGCTGGAGAATTCTG
ACTGCCAAGGACCGCGCGCTGTGGAGAAGGCCAGGACGCTGTACCGCTCCTGCATGAAC
CAGAGTGTGATAGAGAAGCGAGGCTCTCAGCCCCCTGCTGGACATCTTGGAGGTGGTGGGA
GGCTGGCCGGTGGCGATGGACAGGTGGAACGAGACCGTAGGACTCGAGTGGGAGCTGGAG
CGGCAGCTGGCGCTGATGAATCACAGTTCAACAGGCGCGTCTCATCGACCTCTTCATC
TGGAACGACGACCAGAACTCCAGCCGGCACATCATCTACATAGACCAGCCACCTTGGGC
ATGCCCTCCCAGAGTACTACTTCAACGCGGCAGCAACCGGAAGGTGCGGGAAGCCTAC
CTGCAGTTTCATGGTGTGAGTGGCCACGTTGCTGCGGGAGGATGCAAACCTGCCAGGGAC
AGCTGCCTGGTGCAGGAGGACATGGTGCAGGTGCTGGAGCTGGAGACACAGCTGGCCAAG
GCCACGGTACCCAGGAGGAGAGACACGACGTATCGCCTTGTACCACCGGATGGGACTG
GAGGAGCTGCAAAGCCAGTTTGGCCTGAAGGGATTAACTGGACTCTGTTCATACAACT
GTGCTATCCTCTGTCAAATCAAGCTGCTGCCAGATGAGGAAGTGGTGGTCTATGGCATC
CCCTACCTGCAGAACCTTGAAAACATCATCGACACCTACTCAGCCAGGACCATACAGAAC
TACCTGGTCTGGCGCTGGTGTGGACCGCATTGGTAGCCTAAGCCAGAGATTCAAGGAC
ACACGAGTGAATACCGCAAGGCGCTGTTGGCACAAATGGTGGAGGAGGTGCGCTGGCGT
GAATGTGTGGGCTACGTCAACAGCAACATGGAGAACGCGGTGGGCTCCCTCTACGTGAGG
GAGGCGTTCCCTGGAGACAGCAAGAGCATGGTGCAGAGAACTCATTGACAAGGTGCGGACA
GTGTTTGTGGAGACGCTGGACGAGCTGGGCTGGATGGACGAGGAGTCCAAGAAGAAGGCG
CAGGAGAAGGCCATGAGCATCCGGGAGCAGATCGGGCACCTGACTACATCCTGGAGGAG
ATGAACAGGCGCCTGGACGAGGAGTACTCCAATCTGAATTTCTCAGAGGACCTGTACTTT
GAGAACAGTCTGCAGAACCTCAAGGTGGGCGCCAGCGGAGCCTCAGGAAGCTTCGGGAA
AAGGTGGACCCAAATCTCTGGATCATCGGGCGGCGGTGGTCAATGCGTTCTACTCCCA
AACCAGAAACAGATTGTATTCCTGCGGGATCCTCCAGCCCCCTTCTTCAGCAAGGAG
CAGCCACAGGCCTTGAACCTTGGAGGCATTGGGATGGTGTGATCGGGCACGAGATCACGCAC
GGCTTTGACGACAATGGCCGGAACCTCGACAAGAATGGCAACATGATGGATTGGTGGAGT
AACTTCTCCACCCAGCACTTCCGGGAGCAGTCAGAGTGCATGATCTACCAGTACGGCAAC
TACTCCTGGGACCTGGCAGACGAACAGAACGTGAACGGATTCAACACCCTTGGGGAAAAC
ATTGCTGACAACGAGGGGGTGGCGCAAGCCTATAAGGCCCTACCTCAAGTGGATGGCAGAG
GGTGGCAAGGACCAGCAGCTGCCCGGCCCTGGATCTCACCATGAGCAGCTCTTCTTCATC
AACTATGCCCAGGTGTGGTGGGGTCTACCGGCCGAGTTCGCCATCCAATCCATCAAG
ACAGACGTCCACAGTCCCCTGAAGTACAGGGTACTGGGGTCGCTGCAGAACCTGGCCGCC
TTGCGAGACACGTTCCACTGTGCCGGGGCACCCCCATGCACCCCAAGGAGCGATGCCGC
GTGTGGTAGCCAAGGCCCTGCCGCGCTGTGCGGCCCCACGCCACCTGCTGCTCGGAGGCA
TCTGTGCGAAGGTGCAGCTAGCGGCGACCCAGTGTACGTCCCGCCCCGGCCAACCATGCC
AAGCCTGCCCTGCCAGGCCTCTGCGCCTGGCCTAGGGTGCAGCCACCTGCCTGACACCCAG
GGATGAGCAGTGTCCAGTGCAGTACCTGGACCGGAGCCCCCTCCACAGACACCCGCGGGG
CTCAGTGCCCCCGTACAGCTCTGTAGAGACAATCAACTGTGTCTGCCCACCTCCAAG
GTGCATTGTCTTCCAGTATCTACAGCTTCAGACTTGAGCTAAGTAAATGCTTCAAAGAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

20

30

40

【0494】

【表4】

配列番号 2

+1 オープンリーディングフレーム中の cDNA の翻訳から予測される ヒト S E

P タンパク質

MGKSEGPVGMVESAGRAGQKRPGFLEGGLLLLLLLLVTAALVALGVLYADRRGKQLPRLAS
RLCFLQEERTFVKRKPRGIPEAQEVSEVCTTPGCVIAAARILQNMDPTTEPCDDFYQFAC
GGWLRHHVIPETNSRYSIFDVLRLDELEVLKAVLENSTAKDRPAVEKARTLYRSCMNQSV
IEKRGSQPLLDILEVVGWVPVAMDRWNETVGLEWELERQLALMNSQFNRRVLIDLFIWND
DQNSSRHIIYIDQPTLGMPSSREYYFNGGSSNRKVREAYLQFMVSVATLLREDANLPRDSCL
VQEDMVQVLELETQLAKATVPQEERHDVIALYHRMGLEELQSQFGLKGFNWTFLFIQTVLS
SVKIKLLPDEEVVVYGI PYLQNLNII DTYSARTIQNYLVWRLVLDRIQSLSQRFKDTRV
NYRKALFGTMVEEVVRWRECVGYVNSNMENAVGSLYVREAFPGDSKSMVRELIDKVRTVFV
ETLDELGWMDEESKKKAQEKAMSIREQIGHDPDYILEEMNRLDEEYSNLNFSEDLYFENS
LQNLKVGAQRSLRKLREKVDPNLWII GAAVVNAFYSPNRNQIVFPAGILQPPFFSKEQPQ
ALNFGGIGMVGHEITHGFDDNGRNFDKNGNMMDWWSNFSSTQHFREQSECMYQYGNYSW
DLADEQNVNGFNTLGENIADNGGVRQAYKAYLKWMAEGGKDQQLPGLDLTHEQLFFINYA
QVWCGSYRPEFAIQSIKTDVHSPLKYRVLGSLQNLAAAFADTFHCARGTPMHPKERCRVW

10

20

配列番号 3

プライマー

CTGTCTTGATGGATTGGATG

30

配列番号 4

プライマー

GTCCTTGGCAGTCGAATTCTCC

40

【 0 4 9 5 】

【 表 5 】

配列番号 5

ヒトSEPをコードするヌクレオチド配列 (cDNA) - 5' および3' 部分ベ
クター配列を含む (強調されている)

```

CAGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGAATTTTGTAAATACGACTCACTATAGGGCGGCGCG
AATTGGGCACCAGCTCAGCCCCAAGCCACTGCTCTCCCATCCCAGTCCCTGGAAATCCAC
CCACTTGGCCCAGCTCACCCTCAACTCCAACCCACTGGGACCCAGTCTCCAGGGGCTGAC
TGTGGGCGGCAGCCACTCCTGAGTGAGCAAAGGTTCTCCGCGGTGCTCTCCCGTCCAGA
GCCCTGCTGATGGGGAAGTCCGAAGGCCCGTGGGGATGGTGGAGAGCGCTGGCCGTGCA
GGGCAGAAAGCGCCGGGTTCTTGSAGGGGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGTGACC
GCTGCCCTGGTGGCCTTGGGTGTCCTCTACGCCGACCGCAGAGGGAAGCAGCTGCCACGC
CTTGCTAGCCGGCTGTGCTTCTTACAGGAGGAGAGGACCTTTGTAAAACGAAAACCCCGA
GGGATCCAGAGGCCAAGAGGTGAGCGAGGTCTGCACCACCCCTGGCTGCGTGATAGCA
GCTGCCAGGATCCTCCAGAACATGGACCCGACCACGGAACCGTGTGACGACTTCTACCAG
TTTGTCATGCGGAGGCTGGCTGCGGCGCCACGTGATCCCTGAGACCAACTCAAGATACAGC
ATCTTTGACGTCCTCCGCGACGAGCTGGAGGTCACTCTCAAAGCGGTGCTGGAGAATTG
ACTGCCAAGGACCGCGCGGCTGTGGAGAAGGCCAGGACGCTGTACCGCTCCTGCATGAAC
CAGAGTGTGATAGAGAAGCGAGGCTCTCAGCCCTGCTGGACATCTTGGAGGTGGTGGGA
GGCTGGCCCGGTGGCGATGGACAGGTGGAACGAGACCGTAGGACTCGAGTGGGAGCTGGAG
CGGCAGCTGGCGCTGATGAACCTCACAGTTCAACAGGCGCGTCTCATCGACCTCTTCATC
TGGAACGACGACCAGAACTCCAGCCGGCACATCATCTACATAGACCAGCCACCTTGGGC
ATGCCCTCCCGAGAGTACTACTTCAACGGCGGCAGCAACCGGAAGGTGCGGGAAGCCTAC
CTGCAGTTTCATGGTGTGAGTGGCCACGTTGCTGCGGGAGGATGCAAACTGCCAGGGAC
AGCTGCCTGGTGCAGGAGGACATGGTGCAGGTGCTGGAGCTGGAGACACAGCTGGCCAAG
GCCACGGTACCCAGGAGGAGAGACACGACGTCACTCGCTTGTACCACCGGATGGGACTG
GAGGAGCTGCAAGGCCAGTTTGGCCTGAAGGGATTAACTGGACTCTGTTTCATACAACT
GTGCTATCCTCTGTCAAATCAAGCTGCTGCCAGATGAGGAAGTGGTGGTCTATGGCATC
CCCTACCTGCAGAACCTTGAACATCATCGACACCTACTCAGCCAGGACCATAACAGAAC
TACCTGGTCTGGCGCCTGGTGTGACCGCATTTGGTAGCCTAAGCCAGAGATTCAAGGAC
ACACGAGTGAACCTACCGCAAGGCGCTGTTTGGCACAATGGTGGAGGAGGTGCGCTGGCGT
GAATGTGTGGGCTACGTCAACAGCAACATGGAGAAGCGGTGGGCTCCCTCTACGTCAGG
GAGGCGTTCCCTGGAGACAGCAAGAGCATGGTCAGAGAACTCATTGACAAGGTGCGGACA
GTGTTTGTGGAGACGCTGGACGAGCTGGGCTGGATGGACGAGGAGTCCAAGAAGAAGGCG
CAGGAGAAGGCCATGAGCATCCGGGAGCAGATCGGGACCCCTGACTACATCCTGGAGGAG
ATGAACAGGCGCCTGGACGAGGAGTACTCCAATCTGAACCTCTCAGAGGACCTGTACTTT
GAGAACAGTCTGCAGAACCTCAAGGTGGGCGCCAGCGGAGCCTCAGGAAGCTTCGGGAA
AAGGTGGACCCAAATCTCTGGATCATCGGGGCGGCGGTGGTCAATGCGTTCTACTCCCA
AACCAGAAACCAGATTGTATTCCTGCGGGATCCTCCAGCCCCCTTCTTCAGCAAGGAG
CAGCCACAGGCCTTGAACCTTGGAGGCATTGGGATGGTGATCGGGCAGGATCACGCAC
GGCTTTGACGACAATGGCCGGAACCTTCGACAAGAATGGCAACATGATGGATTGGTGGAGT
AACTTCTCCACCAAGCATCTCCGGGAGCAGTCAGAGTGCATGATCTACCAGTACGGCAAC
TACTCTTGGGACCTGGCAGACGAACAGAACGTGAACGGATTCAACACCCCTGGGGAAAAC
ATTGCTGACAACGGAGGGGTGCGGCAAGCCTATAAGGCCTACCTCAAGTGGATGGCAGAG
GGTGGCAAGGACCAGCAGCTGCCCCGCGCTGGATCTCACCATGAGCAGCTCTTCTTCATC
AACTATGCCAGGTGTGGTGCGGGTCTACCGGCCGAGTTCGCCATCCAATCCATCAAG
ACAGACGTCCACAGTCCCCTGAAGTACAGGGTACTGGGGTCTGCTGCAGAACCTGGCCGCC
TTTCGACAGACAGTTCCTACTGTGCCCCGGGACCCCCATGCACCCCAAGGAGCGATGCCGC
GTGTGGTAGCCAAGGCCCTGCCGCGCTGTGCGGCCCACGCCACCTGCTGCTCGGAGGCA
TCTGTGCGAAGGTGCAGTAGCGGCGACCCAGTGTACGTCCCGCCCCGGCCAACCATGCC
AAGCCTGCCTGCCAGGCCTCTGCGCCTGGCCTAGGGTGCAGCCACCTGCCCTGACACCCAG
GGATGAGCAGTGTCCAGTGCAGTACCTGGACCGGAGCCCCCTCCACAGACACCCGCGGGG
CTCAGTGCCCCCGTCAAGCTCTGTAGAGACAATCAACTGTGTCTGCCCCACCTCCAAG
GTGCATTGTCTTCCAGTATCTACAGCTTCAGACTTGAGCTAAGTAAATGCTTCAAAGAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCTGACTCTAGATTGCG

```

10

20

30

40

配列番号：1は、ヒトSEPをコードしているヌクレオチド配列 (cDNA) を示す。

【0496】

配列番号：2は、+1読み取り枠中のcDNA配列の翻訳から予想されるヒトSEPタンパク質を示す。

配列番号：3および4は、ヒトSEPをコードしているヌクレオチド配列 (cDNA) の同定で用いられるオリゴヌクレオチドプライマー配列を示す。

50

【0497】

配列番号：5は、5'および3'部分ベクター配列（強調されている）を含めた、ヒトSEPをコードしているヌクレオチド配列（cDNA）を示す。

参考文献

- Argiolas, A. et al (1995), Neuromodulation of penile erection. Prog Neurobiol. 47:235-255.
- Benet, A. E. et al (1994), Male erectile dysfunction assessment and treatment options. Comp. Ther. 20:669-673. 10
- Boolel, M. et al (1996). Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. Br. J. of Urology 78:257-261.
- Carter AJ. et al (1998). Effect of the selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile dysfunction in the anesthetized dog. J. Urol. 160:242-6.
- Chiou, W. F. et al (1998). Relaxation of corpus cavernosum and raised intracavernous pressure by berberine in rabbit. Br. J. Pharmacol. 125:1677-1684. 20
- Jeremy, J. Y. et al (1997). Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro. Br. J. Urology 79:958-963.
- Lerner, S. E. et al (1993). A review of erectile dysfunction: new insights and more questions. J. Urology 149:1246-1255.
- Melman, A. & Gingell, J. C. (1999). The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. J. Urology 161:5-11. 30
- Montague, D. et al (1996). Clinical guidelines panel on erectile dysfunction: Summary report on the treatment of organic erectile dysfunction. J. Urology 156:2007-2011.
- Naylor, A. M. (1998). Endogenous neurotransmitters mediating penile erection. Br. J. Urology 81:424-431.
- NIH Consensus Development Panel on Impotence (1993). NIH Consensus Conference Impotence. J. A. M. A. 270:83. 40
- Omote M. (1999). Pharmacological profiles of sildenafil (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction: efficacy and drug interaction with nitrate. Nippon Yakurigaku Zasshi. 114:213-8.
- Taub. H. C. et al (1993). Relationship between contraction and relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. Urology 42:698-7 50

04.

Traish AM, et al (1999). Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. Endocrinology. 140:1861-8.

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヒトSEP cDNA配列の読み取り枠(ORF)の分析を示す。

【図2】

図2は、blastpアルゴリズムからのペアワイズアラインメントによるヒトSEPの最も密接に関係したヒトタンパク質に対しての比較を示す。 10

【図3】

図3は、blastp(タンパク質)およびfasta(コーディングヌクレオチド)アルゴリズムからのペアワイズアラインメントによるSEPについてのヒト、ラットおよびマウス配列の比較を示す。

【図4】

図4は、触媒ドメインを示すヒトSEPおよび関係したヒトタンパク質の多重アラインメントを示す。

【図5】

図5は、触媒ドメインを示すヒト、ラットおよびマウスSEPタンパク質の多重アラインメントを示す。 20

【図6】

図6は、触媒ドメインを示すヒト、ラットおよびマウスSEPコーディング配列の多重アラインメントを示す。

【図7】

図7は、全SEP様タンパク質の多重アラインメントに由来する放射状樹として表される、Neighbour-Joining Distance 法による系統分析を示す。

【図8】

図8は、多重アラインメントの触媒ドメイン領域に由来する放射状樹として表される、Neighbour-Joining Distance 法による系統分析を示す。 30

【図 1】

ヒトSEPC DNA配列の読み取り枠 (ORF) の分析

```
10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggcaccagctcagccccaagccactgctctccatcccaactccctggaatccaccact
G..T..S..S..A..P..S..H..C..S..P..I..P..V..P..G..N..P..P..T..
A..P..A..Q..P..Q..A..T..A..L..P..S..Q..S..L..E..I..H..P..L..
H..Q..L..S..P..K..P..L..L..S..H..P..S..P..W..K..S..T..H..L..
70      80      90      100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tggcccaagctcaccccaactccaaccactgggaccagctccaggggctgactgtgg
W..P..S..S..P..Q..L..L..Q..P..T..G..T..Q..S..P..G..A..*..L..W..
G..P..A..H..P..N..S..N..P..L..G..P..S..L..Q..G..P..C..C..G..
A..Q..L..T..P..T..P..T..H..W..Q..P..V..S..R..G..L..T..V..G..
130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggcgagccactcctgagtgagcaaggcttctccgggtgctctccgtccagagccct
A..A..A..T..P..E..*..A..K..V..P..P..R..C..S..P..V..Q..S..P..
R..Q..P..L..L..S..E..Q..R..F..L..R..G..A..L..P..S..R..A..L..
G..S..H..S..*..V..S..K..G..S..S..A..V..L..S..R..P..S..P..C..
190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gctgatggggaagtccgaaggcccggtggggtggtggagagcgctggccgtgcaaggca
A..D..G..E..V..R..R..P..R..C..D..G..G..E..R..W..P..C..R..A..
L..M..G..K..S..E..G..F..V..G..M..V..E..S..A..G..R..A..G..Q..
P..W..G..S..P..K..A..P..W..G..W..W..R..A..L..A..V..Q..G..R..
250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gaagcccccgggttctcgagggggggtctgctgctgctgctgctgctgtaucgctgc
E..A..P..G..V..P..G..G..C..A..A..A..A..A..A..G..D..R..C..
K..R..P..G..F..L..E..G..G..L..L..L..L..L..L..V..T..A..A..
S..A..R..G..S..W..R..G..C..C..C..C..C..C..W..*..P..L..P..
670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
caaggaccggccggctgtgtgagaaggccaggagcgtgtaccgctcctgcatgaaccagag
Q..G..P..A..G..C..G..E..G..Q..D..A..V..P..L..L..H..E..P..E..
K..D..R..P..A..V..E..K..A..R..T..L..Y..R..S..C..M..N..Q..S..
R..T..G..R..L..W..R..R..P..G..R..C..T..A..P..A..*..T..R..V..
730     740     750     760     770     780
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tgtgatagagaagcgaggtctctagccctcctggacactcttgagggtggtgggaggtg
C..D..R..E..A..R..L..S..A..P..A..G..H..L..G..G..G..R..L..
V..I..E..K..R..G..S..Q..P..L..L..D..I..L..E..V..V..G..G..W..
*..*..R..S..E..A..L..S..P..C..W..T..S..W..R..W..E..A..G..
790     800     810     820     830     840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gccgggtggcatggacaggtggaacgagaccgtagactcgagtggaagctggagcgca
A..G..G..D..G..Q..V..E..R..D..R..R..T..R..V..G..A..G..A..A..
P..V..A..M..D..R..W..N..E..T..V..G..L..E..W..E..L..E..R..Q..
R..W..R..W..T..G..G..T..R..P..*..D..S..S..G..S..W..S..G..S..
850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gctggcgctgatgaactcacagttcaacaggcgctctcatcgacctcttcatctggaa
A..G..A..D..E..L..T..V..Q..Q..A..R..P..H..R..P..L..H..L..E..
L..A..L..M..N..S..Q..F..N..R..R..V..L..I..D..L..F..I..W..N..
W..R..*..*..T..H..S..S..T..G..A..S..S..S..T..S..S..S..G..T..
910     920     930     940     950     960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cgacgaccagaactccagccggccacatcatctatagacagcccaacttgggaatgcc
R..R..P..E..L..Q..P..A..H..H..L..H..R..P..A..H..L..G..H..A..
D..D..Q..N..S..S..R..R..I..I..Y..I..D..Q..P..T..L..G..M..P..
T..T..R..T..P..A..G..T..S..S..T..*..T..S..P..P..W..A..C..P..
970     980     990     1000    1010    1020
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ctcccagagtaactacttcaacggcgccagcaacccggaaggtgcgggaagctacactgca
L..P..R..V..L..L..Q..Q..R..R..Q..Q..P..E..G..A..G..S..L..P..A..
S..R..E..Y..Y..F..N..G..G..S..N..R..K..V..R..E..A..Y..L..Q..
P..E..S..T..T..S..T..A..A..A..T..G..R..C..G..K..P..T..C..S..
310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cctgggtggccttgggtgtctctctacgcgcgacgcgaggggaagcagctgcccacgcttgc
P..G..G..L..G..C..P..L..R..R..P..Q..R..E..A..A..A..T..P..C..
L..V..A..L..G..V..L..Y..A..D..R..R..G..K..Q..L..P..R..L..A..
W..W..P..W..V..S..S..T..P..T..A..E..G..S..S..C..H..A..L..L..
370     380     390     400     410     420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tagccggctgtgctcttaccagggagggagacctttgtaaaacgaaaaccccgagggat
*..P..A..V..L..L..T..G..G..E..D..L..C..K..T..K..T..P..R..D..
S..R..L..C..F..L..Q..E..E..R..T..F..V..K..R..K..P..R..G..I..
A..G..C..A..S..Y..R..R..R..G..P..L..*..N..E..N..P..E..G..S..
430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cccagaggcccaagagtggaagcaggtctgcaccacccctgggtgcgtgtagcagctgc
P..R..G..P..R..G..E..R..G..L..H..H..P..W..L..R..D..S..S..C..
P..E..A..Q..E..V..S..E..V..C..T..P..G..C..V..I..A..A..A..
Q..R..P..K..R..*..A..R..S..A..P..P..L..A..A..*..*..Q..L..P..
490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
caggatcctccagaacatggaccgccaccggaacccgtgtgacgactcttaccagtttgc
Q..D..P..P..E..H..G..P..D..H..G..T..V..*..R..L..L..P..V..C..
R..I..L..Q..N..M..D..P..T..T..E..P..C..D..F..Y..Q..F..A..
G..S..S..R..T..W..T..R..P..R..N..R..V..T..T..S..T..S..L..H..
550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atcgaggagctgctgctgcggcgccacgtgatccctgagaccacactcaagatcacagatctt
M..R..R..L..A..A..A..P..R..D..P..*..D..Q..L..K..I..Q..H..L..
C..G..G..W..L..R..R..H..V..I..P..E..T..N..S..R..Y..S..I..F..
A..E..A..G..C..G..A..T..*..S..L..R..P..T..Q..D..T..A..S..L..
610     620     630     640     650     660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tgacgtctccgcgacgagctggaggctcactcctcaagcgggtgctggagaattcgactgc
*..R..P..P..R..R..A..G..G..H..P..Q..S..G..A..G..E..F..D..C..
D..V..L..R..D..E..L..E..V..I..L..K..A..V..L..E..N..S..T..A..
T..S..S..A..T..S..W..R..S..S..S..K..R..C..W..R..I..R..L..F..
1030    1040    1050    1060    1070    1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gttcattgtgtcagtgccacgttctgctgcgggaggtgcaaacctgccacaggscagctg
V..H..G..V..S..G..H..V..A..A..G..G..C..K..P..A..Q..G..Q..L..
F..M..V..S..V..A..T..L..L..R..E..D..A..N..L..P..R..D..S..C..
S..W..C..Q..W..P..R..C..C..G..R..M..Q..T..C..P..G..T..A..A..
1090    1100    1110    1120    1130    1140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cctgggtcaggaggacatgggtgcaggtgctggagctggagacacagctggccaaggccac
P..G..A..G..G..H..G..A..G..A..G..A..G..D..T..A..G..Q..G..H..
L..V..Q..E..D..M..V..Q..V..L..E..L..E..Y..Q..L..A..K..A..T..
W..C..R..R..T..W..C..R..C..W..S..W..R..H..S..W..P..R..P..R..
1150    1160    1170    1180    1190    1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggtaccocaggaggagagacagcagctcatcgcttgcctgtatcacccggatgggactggagga
G..T..P..G..G..E..T..R..R..H..R..L..V..P..P..D..G..T..G..T..
V..P..Q..E..E..R..H..D..V..I..A..L..Y..H..R..M..G..L..E..E..
Y..P..R..R..R..D..T..T..S..S..P..C..T..T..G..W..D..W..R..S..
1210    1220    1230    1240    1250    1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gtgcgaagccagtttggcctgaagggtttaaactggactctgttcatacaaaactgtgct
A..A..K..P..V..W..P..E..G..I..*..L..D..S..V..H..T..N..C..A..
L..Q..S..Q..F..G..L..K..G..F..N..W..T..L..F..I..Q..T..V..L..
C..K..A..S..L..A..*..R..D..L..T..G..L..C..S..Y..K..L..C..Y..
1270    1280    1290    1300    1310    1320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atcctctgtcaaaatcaagctgctgccagatgagggaagtggtgtctatggcactcccta
I..L..C..Q..N..Q..A..A..A..R..*..G..S..G..G..L..W..H..P..L..
S..S..V..K..I..K..L..L..P..D..E..E..V..V..V..Y..G..I..P..Y..
P..L..S..K..S..S..C..C..Q..M..R..K..W..W..S..M..A..S..P..T..
1330    1340    1350    1360    1370    1380
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cctgcagaacctgaaacatcatcgacacactactcagccaggaccatacagaactacct
P..A..E..P..*..K..H..H..R..H..L..L..S..Q..D..H..T..E..L..P..
L..Q..N..L..E..N..I..I..D..T..Y..S..A..R..T..I..Q..N..Y..L..
C..R..T..L..K..T..S..S..T..P..T..Q..P..G..P..Y..R..T..T..W..
```

1390 1400 1410 1420 1430 1440
.....
gggtctggcgctggtgctggagcgcgattggtaacctaagccagagattcaaggacacacg
G..L..A..P..G..A..G..P..H..W..*..P..K..P..E..I..Q..G..H..T..
V..W..R..L..V..L..D..R..I..G..S..L..S..Q..R..F..K..D..T..R..
S..G..A..W..C..W..T..A..L..V..A..*..A..R..D..S..R..T..H..E..

1450 1460 1470 1480 1490 1500
.....
agtgaactacgcgaaggcgctgcttggcacaaatggtggaggaggtgcgctggcgtaagt
S..E..L..P..Q..G..A..V..W..H..N..G..G..G..G..A..L..A..*..M..
V..N..Y..R..K..A..L..F..G..T..M..V..E..E..V..R..W..R..E..C..
*..T..T..A..R..R..C..L..A..Q..W..W..R..R..C..A..G..V..N..V..

1510 1520 1530 1540 1550 1560
.....
tgtgggctacgtcaacagcaacstggagagcgcgctgggctccctctacgtcaggggagc
C..G..L..R..Q..Q..Q..H..G..E..R..R..G..L..P..L..R..Q..G..G..
V..G..Y..V..N..S..N..M..E..N..A..V..G..S..L..Y..V..R..E..A..
W..A..T..S..T..A..T..W..R..T..P..W..A..P..S..T..S..G..R..R..

1570 1580 1590 1600 1610 1620
.....
gttccctggagacagcaagagcattgtaacagagcattgtaacagagcattgtaac
V..P..W..R..Q..Q..E..H..G..Q..R..T..H..*..Q..G..A..D..S..V..
F..P..G..D..S..K..S..M..V..R..E..L..I..D..K..V..R..T..V..F..
S..L..E..T..A..R..A..W..S..E..N..S..L..T..R..C..G..Q..C..L..

1630 1640 1650 1660 1670 1680
.....
tgtggagacgctggagcagctgggctggatggagcaggagtcacagaagagcgagga
C..G..D..A..G..R..G..L..D..G..R..G..R..G..V..Q..E..E..G..A..G..
V..E..T..L..D..E..L..G..W..M..D..E..E..S..K..K..K..A..Q..E..
W..R..R..W..T..S..W..A..G..W..T..R..S..P..R..R..R..R..R..

1690 1700 1710 1720 1730 1740
.....
gaaggccatgagcatccgggagcagatcgggcaaccctgactacatcctggagagatgaa
E..G..H..E..H..P..G..A..D..R..A..P..*..L..H..P..G..G..D..E..
K..A..M..S..I..R..E..Q..I..G..H..P..D..Y..I..L..E..E..M..N..
R..P..*..A..S..G..S..R..S..G..T..L..T..T..S..W..R..R..*..T..

2110 2120 2130 2140 2150 2160
.....
ctccaccagcacttcgggagcagtcagagtgcatgatcaccgtacgcgaactactc
L..H..P..A..L..P..G..A..V..R..V..H..D..L..P..V..R..Q..L..L..
S..T..Q..H..F..R..E..Q..S..E..C..M..I..Y..Q..Y..G..N..Y..S..
P..P..S..T..S..G..S..S..Q..S..A..*..S..T..S..T..A..T..T..P..

2170 2180 2190 2200 2210 2220
.....
ctgggacctggcgaagcgaacagaacgtgaacgattcaacacccttgggaaacattgc
L..G..P..G..R..R..T..E..R..E..R..I..Q..H..P..W..G..K..H..C..
W..D..L..A..D..E..Q..N..V..N..G..F..N..T..L..G..E..N..I..A..
G..T..W..Q..T..N..R..T..*..T..D..S..T..P..L..G..K..T..L..L..

2230 2240 2250 2260 2270 2280
.....
tgacaacggagggtgctggcgaacgctataaaggcctacctgaagtggatggcagaggggtg
..Q..R..R..G..A..A..S..L....G..L..P..Q..V..D..G..R..G..W..
D..N..G..G..V..R..Q..A..Y..K..A..Y..L..K..W..M..A..E..G..G..
T..T..E..G..C..G..K..P..R..R..P..T..S..S..G..W..Q..R..V..A..

2290 2300 2310 2320 2330 2340
.....
caaggaccagcagctgccgcgctggatctcaccatgagcagctcttcttccatcaacta
Q..G..P..A..A..A..R..P..G..S..H..P..*..A..A..L..L..R..Q..L..
K..D..Q..Q..L..P..G..L..D..L..T..H..E..Q..L..F..F..I..N..Y..
R..T..S..S..C..P..A..W..I..S..P..M..S..S..S..S..S..S..T..M..

2350 2360 2370 2380 2390 2400
.....
tgcccaggctggtggtggcggtcctaccggcccgagtgccatccaatccaatcaagacaga
C..P..G..V..V..R..V..L..P..A..R..V..R..H..P..I..H..Q..D..R..
A..Q..V..W..C..G..S..Y..R..P..E..F..A..I..Q..S..I..K..T..D..
P..R..C..G..A..G..P..T..G..P..S..S..P..S..N..P..S..R..Q..T..

2410 2420 2430 2440 2450 2460
.....
cgtccacagtcctcctgaagtacagggtactggggtcgctgcgaacactggccgccttcgc
R..P..Q..S..P..E..V..Q..G..T..G..V..A..A..E..P..G..R..L..R..
V..H..S..P..L..K..Y..R..V..L..G..S..L..Q..N..L..A..A..F..A..
S..T..V..P..*..S..T..G..Y..W..G..R..C..R..T..W..P..P..S..Q..

1750 1760 1770 1780 1790 1800
.....
caggcgctggagcagagtagtactccaactctgaactctcagaggaacctgactcttgagaa
Q..A..P..G..R..G..V..L..Q..S..E..L..L..R..G..P..V..L..*..E..
R..R..L..D..E..S..Y..S..N..L..N..F..S..E..D..L..Y..F..E..N..
G..A..W..T..R..S..T..P..I..*..T..S..Q..R..T..C..T..L..R..T..

1810 1820 1830 1840 1850 1860
.....
cagctctgcagaacctcaagggtggcgcccgagcggagcctcaaggagcttcgggaaaaggt
Q..S..A..E..P..Q..G..G..R..P..A..E..P..Q..E..A..S..G..K..G..
S..L..Q..N..L..K..V..G..A..Q..R..S..L..R..K..L..R..S..K..V..
V..C..R..T..S..R..W..A..P..S..G..A..S..G..S..T..G..K..R..W..

1870 1880 1890 1900 1910 1920
.....
ggaccocaaatctctggatcatcgggcgcggtgggtcaatgcggtctactcctcccaacgc
G..P..K..S..L..D..H..R..G..G..G..G..Q..C..V..L..L..P..K..P..
D..P..N..L..W..T..I..G..A..A..V..V..N..A..P..Y..S..P..N..R..
T..Q..I..S..G..S..S..G..R..R..W..S..M..R..S..T..P..Q..T..E..

1930 1940 1950 1960 1970 1980
.....
aaaccagattgtattccctgcgggactcctccagccccctcttctcagcaaggagcagcc
K..P..D..C..I..P..C..R..D..P..P..A..P..L..L..Q..Q..G..A..A..
N..Q..I..V..F..P..A..G..I..L..Q..P..F..F..S..K..E..Q..P..
T..R..L..Y..S..L..P..G..S..S..S..P..P..S..S..A..R..S..S..H..

1990 2000 2010 2020 2030 2040
.....
acaggccctgaacttggaggccttgggatgggtgatcgggcagcagatcaagcgaaggctt
T..G..L..E..L..W..R..H..W..D..G..D..R..A..R..D..H..L..Q..L..
Q..A..L..N..F..G..G..I..G..M..V..I..G..H..E..I..T..H..G..P..
R..P..*..T..L..E..A..L..G..W..*..S..G..T..R..S..R..T..A..L..

2050 2060 2070 2080 2090 2100
.....
tgacgacaatggcgggaacttcgacaagaatggcaacatgatggattggtggagtaactt
..R..Q..W..F..S..L..R..Q..E..W..Q..H..D..G..L..V..E....L..
D..D..N..G..R..N..F..D..K..N..G..N..M..M..D..W..W..S..N..F..
T..T..M..A..G..T..S..T..R..M..A..T..*..W..I..G..G..V..T..S..

2470 2480 2490 2500 2510 2520
.....
agacacgttccactgtgccggggcaccoccatgacocccaaggagcgatgccgcgtgtg
R..H..V..P..L..C..P..G..H..P..H..A..P..Q..G..A..M..P..R..V..
D..T..F..H..C..A..R..G..T..P..M..H..P..K..E..R..C..R..V..W..
T..R..S..T..V..P..G..A..P..P..C..T..P..R..S..D..A..A..C..G..

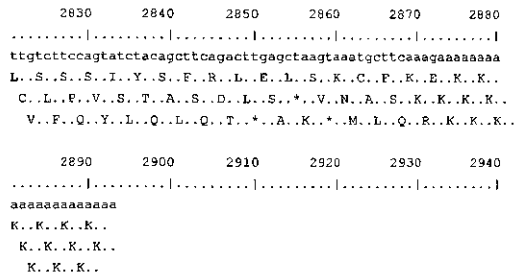
2530 2540 2550 2560 2570 2580
.....
gtagccaaggccctgcccgcgtgtgcccacgcgccactgctgctcggagcagctctgt
V..A..K..A..L..P..R..C..A..A..H..L..L..L..G..G..I..C..
*..P..R..P..C..R..A..V..R..P..T..P..T..C..C..S..E..A..S..V..
S..Q..G..P..A..A..L..G..G..P..R..P..P..A..A..R..R..H..L..C..

2590 2600 2610 2620 2630 2640
.....
ggcaagggtgcagctagcggcgacccagtgtagctccgcgccggcgaacctgcgaagcc
A..K..V..Q..L..A..A..T..Q..C..T..S..R..P..Q..P..C..Q..A..
R..R..C..S..*..R..R..P..S..V..R..P..A..P..A..N..H..A..K..F..
E..G..A..A..S..G..D..P..V..Y..V..P..P..R..P..T..M..P..S..L..

2650 2660 2670 2680 2690 2700
.....
tgccctgcaggcctctgcgcctggcctagggtgcagcgaactgctgcacccaggggtg
C..L..P..G..L..C..A..W..P..R..V..Q..P..P..A..*..H..P..G..M..
A..C..Q..A..S..A..P..G..L..G..C..S..H..L..P..D..T..Q..G..*..
P..A..R..P..L..R..L..A..*..G..A..A..T..C..L..T..P..R..D..E..

2710 2720 2730 2740 2750 2760
.....
agcagtgctcagtgtagtacctggacccggagcccccctccacagacaccgggggctcag
S..S..V..Q..C..S..T..W..T..G..A..P..S..T..D..T..R..G..A..Q..
A..V..S..S..A..V..P..G..P..E..P..P..P..Q..T..P..A..G..L..S..
Q..C..F..V..Q..Y..L..D..R..S..P..L..H..R..H..P..R..G..S..V..

2770 2780 2790 2800 2810 2820
.....
tgcccgcgtcagcagctctgtagagacaatcaactgtgctcgtccacccctccaagggtgca
C..P..R..H..S..S..V..E..T..I..N..C..V..L..P..T..L..Q..G..A..
A..P..V..T..A..L..*..R..Q..S..T..V..S..C..P..P..S..K..V..H..
P..P..S..Q..L..C..R..D..N..Q..L..C..P..A..H..P..P..R..C..I..



【 図 2 】

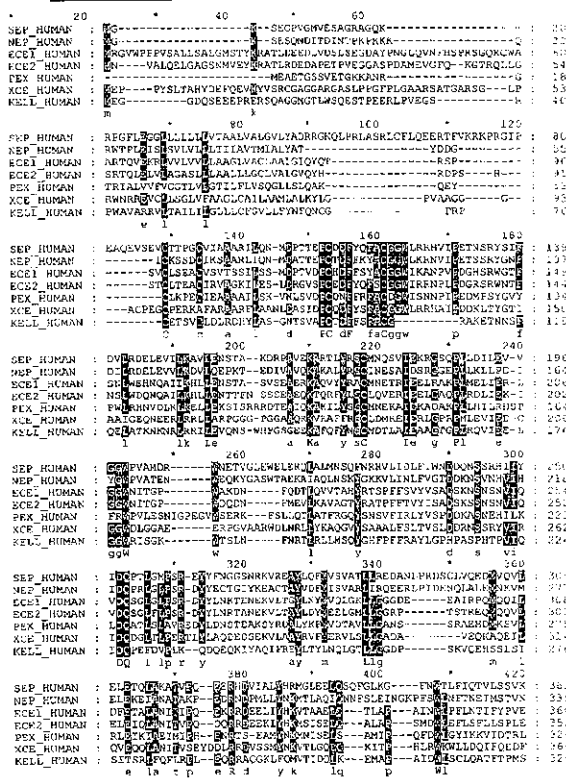
ヒトSEPの最も近縁のヒトタンパク質へのblastpアル

ゴリズムからの対方式アラインメントによる比較

Swiss-Prot タンパク質名	全タンパク質	触媒ドメイン
SEP HUMAN	100% (779/779)	100% (209/209)
NEP HUMAN	54% (382/696)	66% (139/209)
ECE1 HUMAN	39% (281/707)	54% (113/209)
ECE2 HUMAN	39% (298/757)	52% (109/209)
PEX HUMAN	39% (284/723)	50% (108/214)
XCE HUMAN	36% (257/710)	48% (101/209)
KELL HUMAN	27% (189/700)	36% (77/209)

【図 4】

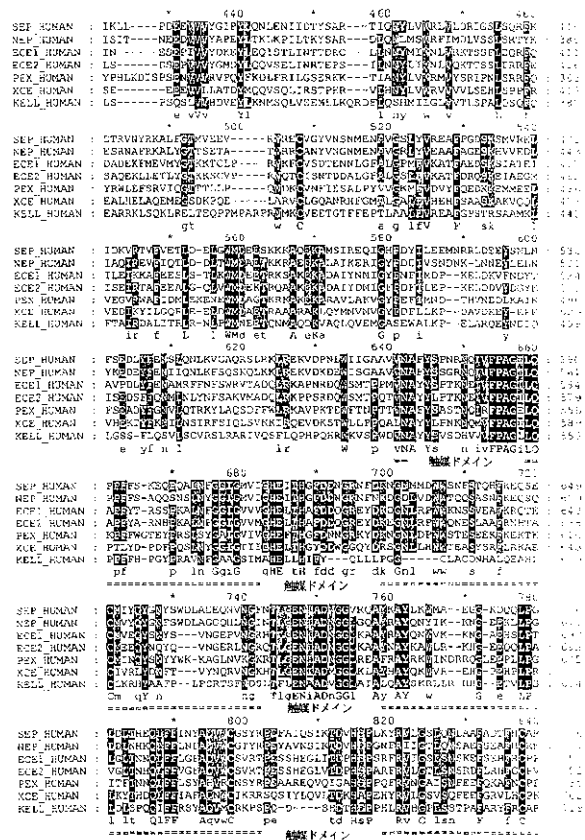
触媒ドメインを示すヒトSEPOおよび関係したヒトタンパク質
の多重アラインメント



【図 3】

SEPのヒト、ラットおよびマウス配列のblastp (タンパク質) およびfasta (コーディングヌクレオチド) アルゴリズムからの対方式アラインメントによる比較

種	タンパク質 (同一性%)	コーディングヌクレオチド (同一性%)
ヒト	100% (779/779)	100% (2337 重複)
マウス	77% (690/770)	82% (2082 重複)
ラット	77% (607/780)	82% (2109 重複)



[illegible]

```

SEP_HUMAN : 740 760 780
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 800 820 840
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 860 880 900
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 920 940 960
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 980 1000 1020
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1040 1060
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1080 1100 1120
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1140 1160 1180
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1200 1220 1240
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1260 1280 1300
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1320 1340 1360
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1380 1400 1420
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1440 1460 1480
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1500 1520 1540
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1560 1580 1600
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :

```

```

SEP_HUMAN : 2300 2320 2340
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :

```

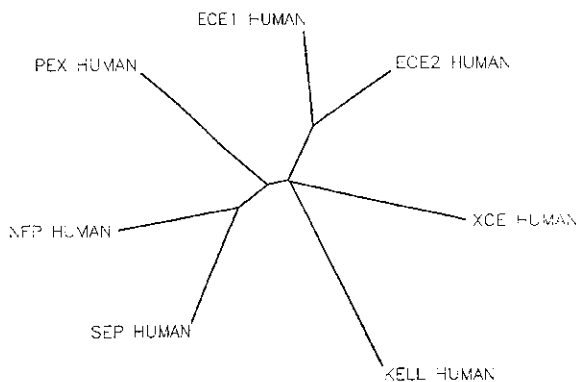
```

SEP_HUMAN : 1580 1600 1620
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1640 1660 1680
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1700 1720 1740
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1760 1780 1800
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1820 1840 1860
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1880 1900 1920
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 1940 1960 1980
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 2000 2020 2040
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 2060 2080 2100
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 2120 2140 2160
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 2180 2200 2220
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :
SEP_HUMAN : 2240 2260 2280
SEP_RAT :
SEP_MOUSE :

```

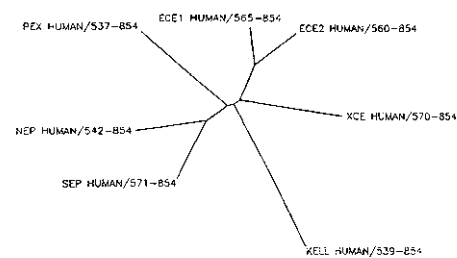
【図 7】

全 SEP 様タンパク質の多重アラインメントに由来する放射状
樹として表される、Neighbour-Joining Distance 法による系統
分析



【図 8】

多重アラインメントの触媒ドメイン領域に由来する放射状樹と
して表される、Neighbour-Joining Distance 法による系統分析



【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
24 January 2002 (24.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06492 A1(51) International Patent Classification: C12N 15/57,
9/64, C07K 14/47, 16/40, A61K 38/53, 39/395, C12N
5/10, 1/21

(21) International Application Number: PCT/GB01/01263

(22) International Filing Date: 16 July 2001 (16.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(36) Priority Data: 0017387.2 14 July 2000 (14.07.2000) GB

(71) Applicant (for GB only): PFIZER LIMITED (GB/GB);
Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NF (GB).(72) Applicant (for all designated States except GB, ES):
PFIZER, INC. (US/US); 235 East 42nd Street, New York,
NY 10017 (US).

(73) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HARROW, Ian,
Dennis (GB/GB); Pfizer Global Research and Develop-
ment, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NF (GB);
STACKY, Peter (GB/GB); Pfizer Global Research and
Development, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13
9NF (GB); WALSH, Roderick, Thomas (IE/GB); Pfizer
Global Research and Development, Ramsgate Road, Sand-
wich, Kent, CT13 9NF (GB); WAYMAN, Christopher,
Peter (GB/GB); Pfizer Global Research and Develop-
ment, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NF (GB).WAYMAN, Christopher, Peter (GB/GB); Pfizer Global
Research and Development, Ramsgate Road, Sandwich,
Kent, CT13 9NF (GB); PHILLIPS, Stephen, Charles
(GB/GB); Pfizer Global Research and Development,
Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NF (GB).(74) Agents: WOOD, David, J. et al.; Pfizer Limited, Ram-
sgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NF (GB).(81) Designated States (national): AF, 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, GL,
GM, GR, GU, ID, 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, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GN, 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
amendmentsFor 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.

WO 02/06492 A1

(54) Title: A NOVEL HUMAN SOLUBLE SECRETED ENDOPEPTIDASE (SEP) FOR THE TREATMENT OF SEXUAL DY-
SFUNCTION(57) Abstract: Polynucleotide sequences encoding a novel human soluble secreted endopeptidase (SEP) at SEQ ID NO:2 are de-
scribed and polypeptide sequences are described. The polypeptide sequences comprise one or more of: (a) a polypeptide having
the deduced amino acid sequence translated from the polynucleotide sequences in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO: 5 and variants,
fragments, homologues, analogues and derivatives thereof; (b) a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and variants, fragments, homologues,
analogues and derivatives thereof; (c) a polypeptide encoded by the cDNA Aa NCIMB 41110 and variants, fragments, homologues,
analogues and derivatives thereof; or (d) a polypeptide which at least 78 % identify to (b) the polypeptide encoded by the poly-
nucleotide of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. (ii) the polypeptide of SEQ ID NO: 2, or (iii) the polypeptide encoded by the cDNA
of NCIMB 41110. Such polypeptides sequences are, *inter alia*, useful in the prophylaxis and/or treatment of sexual dysfunction, in
particular male erectile dysfunction (MED) or female sexual dysfunction (FSD), preferably female sexual arousal disorder (FAD)

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

A NOVEL HUMAN SOLUBLE SECRETED ENDOPEPTIDASE (SEP) FOR THE TREATMENT OF SEXUAL DYSFUNCTION

Technical field

5

The present invention relates to an enzyme. The present invention also relates to a nucleotide sequence encoding the same.

In particular, the present invention relates to a novel nucleic acid sequence encoding a novel soluble secreted endopeptidase (SEP).

10

The present invention also relates to the use of the novel nucleic acid and amino acid sequences in the diagnosis and prophylaxis and/or treatment of disease.

The present invention also relates, *inter alia*, to the use of the novel nucleic acid and amino acid sequences to evaluate and/or screen for agents that can modulate, preferably inhibit, more preferably selectively inhibit endopeptidase activity.

15

The present invention further relates to compounds and pharmaceutical compositions useful in the prophylaxis and/or treatment of sexual dysfunction, for example female sexual dysfunction (FSD), in particular female sexual arousal disorder (FSAD).

20

The present invention yet further relates to a method of prophylaxis and/or treatment of FSD, in particular FSAD.

25

The present invention also relates to assays to screen for compounds useful in the prophylaxis and/or treatment of FSD, in particular FSAD.

The present invention relates to compounds and pharmaceutical compositions for use in the prophylaxis and/or treatment of male sexual dysfunction, in particular male erectile dysfunction (MED). Male sexual dysfunction as referred to herein is meant to include

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

ejaculatory disorders such as premature ejaculation, anorgasmia (unable to achieve orgasm), or desire disorders such as hypoactive sexual desire disorder (lack of interest in sex).

5 The present invention also relates to a method of prophylaxis and/or treatment of MED.

The present invention further relates to assays to screen for compounds useful in the prophylaxis and/or treatment of male sexual dysfunction, in particular MED.

10

Background of the invention

HUMAN SOLUBLE SECRETED ENDOPEPTIDASE (HUMAN SEP)

15 Proteases form a large family of enzymes that cleave proteins and peptides at the peptide bond that forms the backbone of the peptide or protein chain. Proteases are found in all organisms from bacteria to man. In humans approximately 1% of all genes (400-1000) are predicted to encode protease enzymes. They participate in activation and maturation of nascent polypeptides, the degradation of mis-folded and damaged proteins, and the
20 controlled turnover of peptides and proteins both inside, and outside, the cell. Their activities are important for many processes including digestion, normal growth, endocrine function, wound healing, inflammation, angiogenesis, tissue remodelling during embryonic development, tumour metastasis, cardiovascular disease, neurological disease, and bacterial, parasitic, and viral infections.

25

Proteases can be broadly categorised on the basis of where they cleave their substrate. Exopeptidases, which include aminopeptidases, dipeptidyl peptidases, tripeptidases, carboxypeptidases, peptidyl-di-peptidases, dipeptidases and omega peptidases, cleave
30 residues at the termini of their substrate. Endopeptidases, including serine proteases, cysteine proteases, and metalloendopeptidases, cleave at a sequence within the peptide.

An important group of endopeptidases known as zinc metalloproteases are characterised

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

by having a requirement for the binding of a zinc ion in their catalytic site. Zinc metalloproteases can be subdivided into classes (for review see FEBS Letters 354 (1994) pp. 1-6), with one such class being the neprilysin (NEP)-like zinc metalloproteases (FASEB Journal, Vol 11, 1997 pp. 355-384). The NEP class includes at least 7 enzymes
5 that are structurally related to each other (see later). They are typically membrane-bound, with a large carboxy-terminal extracellular domain, a short membrane-spanning region, and a short intracellular domain at the amino terminus. Known members of this family are neprilysin (also called NEP, CD10, CALLA, enkephalinase or EC 3.4.24.11), endothelin-converting enzymes (ECE-1 and ECE-2), PEX, KELL, X-converting
10 enzyme/damage induced neural endopeptidase (XCE/DINE), and an enzyme identified in rodents called soluble secreted endopeptidase/neprilysin II (SEP/NEPII; Ghaddar, G et al, Biochem Journal, Vol 347, 2000, pp. 419-429; Ikeda, K et al, Journal Biological Chemistry, Vol 274, 1999, pp. 32469-32477; Tanja, O et al, Biochem Biophys Research Communication, Vol 271, 2000, pp. 565-570; International Patent Application
15 WO 99/53077). The functions of the members of this class are thought to be related to peptidergic signalling. This is a process that occurs in most organisms, including humans, in which peptide molecules are used as "messengers" to elicit physiological responses. This typically involves the production and release of the peptide messenger by a specific cell, sometimes as an inactive precursor that is cleaved by a protease to become active.
20 The active form of the peptide then binds a specific receptor on the surface of another cell where it elicits a response. The peptide is then inactivated by degradation by another protease.

NEP was the first member of this class to be discovered. NEP is a promiscuous protease
25 in that it is able to proteolyse and inactivate many biological peptides, e.g. enkephalins, bradykinin and substance P. It usually cleaves the peptide on the amino-terminal side of a hydrophobic residue. NEP can be found in many tissues of the body and is most abundant in kidney. Its physiological functions are not fully understood, but one indication from the phenotype of NEP "knockout" mice is that it is involved in preventing
30 endotoxic shock.

ECE-1 is a protein 37% identical to NEP. ECE-1 is broadly distributed throughout the

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

body and converts the inactive precursor peptide big-endothelin into endothelin, which is a potent vasoconstrictor, important for maintaining vascular tone. The ECE-2 enzyme is derived from a separate gene to ECE-1, but its amino acid sequence is similar, with an overall homology of 59%. The physiological importance of ECE-2 to endothelin
5 production is unclear. ECE-2 mRNA is present at much lower levels than ECE-1 mRNA and it has a different pH optimum to ECE-1, being inactive at neutral pH, and most active at pH 5.5.

The KELL enzyme is a clinically important member of the NEP class found in erythroid
10 tissues. The antigens of the KELL blood group system reside in this protein which can cause haemolytic reaction to blood transfusions.

The PEX gene was identified as being genetically linked to a disorder called X-linked hypophosphatemic rickets, a dominant disorder typified by decreased renal tubular
15 phosphate reabsorption. Based on its close homology to the other members of the NEP family (49-60%) it is also predicted to be a membrane-bound metalloprotease, but no substrate has yet been found.

XCE (Valdenaire, O et al, Molecular Brain Research, Vol 64, 1999, pp. 211-221), and its
20 rat equivalent DINE (Kiryu-Seo, S et al, Proceedings of the National Academy of Science USA, 2000, pp. 4345-4350), are expressed predominantly in the central nervous system. DINE expression is up-regulated following neuronal damage, and this is thought to help prevent neuronal apoptosis, possibly as a result of the DINE-mediated proteolytic activation of antioxidant enzymes. A physiological substrate of XCE/DINE has also not
25 yet been identified, but from their sequence they are clearly predicted to be proteases, and for DINE, this has been proven using a synthetic peptide substrate.

Rodent SEP and NEPII were discovered most recently. NEPII is likely to be a rat
equivalent of SEP, which is a mouse enzyme, as they share 91% amino acid identity.
30 They are the members of this class closest to NEP in their amino acid sequence, both being 54% identical to human NEP. The mRNA of both is highly abundant in the testis and can also be detected at low levels in a broad range of other tissues. In the case of rat

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

- NEPIL, the mRNA has also been found at comparatively high levels in the brain and pituitary. When produced recombinantly in mammalian cells, both mouse SEP and rat NEPII can be found in the growth media. This suggests they could be secreted proteases that may be able to circulate and hence cleave peptides at other sites in the body. Mouse
- 5 SEP and rat NEPII, like some other members of this class such as ECE-1, exhibit splice variation. In the case of mouse SEP and rat NEPII, this splice variation results in isoforms with alterations in sequences involved in membrane localisation and secretion. The physiological significance of this is unclear but it is likely there could be membrane-bound, circulating, and intracellular forms of these enzymes. Mouse SEP has been shown
- 10 to be able to cleave a range of important biological peptides including enkephalin, endothelin, big-endothelin, Bradykinin and substance P. Like NEP, therefore, it has a fairly broad substrate specificity and may have several physiological functions in different tissues.
- 15 Enzymes in this NEP class, like other metalloprotease enzymes, have been shown to be amenable to inhibition by small drug-like molecules (for example, thiorphan and phosphoramidon). This, together with the emerging nature of the physiological function of some members of the NEP-like enzymes in modulating peptidergic signalling, makes them attractive targets for pharmaceutical intervention. NEP inhibitors have been
- 20 developed for indications including cardiovascular disease, and it is likely that, as knowledge of their function increases further, specific inhibitors of NEP-like enzymes may have a role in the prophylaxis and/or treatment of many other indications such as sexual dysfunction (especially male sexual dysfunction, e.g. male erectile dysfunction (MED)), and female sexual dysfunction (FSD), e.g. female sexual arousal disorder
- 25 (FSAD)), preterm labour, pre-eclampsia, endometriosis, reproductive disorders (especially male and female infertility, polycystic ovarian syndrome, implantation failure), hypertension, heart failure, angina, renal insufficiency, cyclical oedema, hyperaldosteronism, glaucoma, asthma, inflammation, leukemia, pain, epilepsy, affective disorders, dementia and geriatric confusion, obesity and gastrointestinal
- 30 disorders (especially diarrhoea and irritable bowel syndrome), septic shock, the modulation of gastric acid secretion and the treatment of hyperreninaemia.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

SEXUAL DYSFUNCTION

Sexual dysfunction (SD) is a significant clinical problem which can affect both males and females. The causes of SD may be both organic as well as psychological. Organic aspects of SD are typically caused by underlying vascular diseases, such as those associated with hypertension or diabetes mellitus, by prescription medication and/or by psychiatric disease such as depression. Physiological factors include fear, performance anxiety and interpersonal conflict. SD impairs sexual performance, diminishes self-esteem and disrupts personal relationships thereby inducing personal distress. In the clinic, SD disorders have been divided into female sexual dysfunction (FSD) disorders and male sexual dysfunction (MSD) disorders (Melman *et al* 1999). FSD is best defined as the difficulty or inability of a woman to find satisfaction in sexual expression. Male sexual dysfunction (MSD) is generally associated with erectile dysfunction, also known as male erectile dysfunction (MED) (Benet *et al* 1994).

The compounds of the invention are particularly beneficial for the prophylaxis and/or treatment of sexual dysfunction in the male (e.g. male erectile dysfunction - MED) and in the female - female sexual dysfunction (FSD), e.g. female sexual arousal disorder (FSAD).

FEMALE SEXUAL DYSFUNCTION (FSD)

In accordance with the invention, FSD can be defined as the difficulty or inability of a woman to find satisfaction in sexual expression. FSD is a collective term for several diverse female sexual disorders (Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106; Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluations and treatment options. *Urology*, 54, 385-391.). The woman may have lack of desire, difficulty with arousal or orgasm, pain with intercourse or a combination of these problems. Several types of disease, medications, injuries or psychological problems can cause FSD. Treatments in development are targeted to treat specific subtypes of FSD, predominantly desire and arousal disorders.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The categories of FSD are best defined by contrasting them to the phases of normal female sexual response: desire, arousal and orgasm (Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106). Desire
5 or libido is the drive for sexual expression. Its manifestations often include sexual thoughts either when in the company of an interested partner or when exposed to other erotic stimuli. Arousal is the vascular response to sexual stimulation, an important component of which is genital engorgement and includes increased vaginal lubrication, elongation of the vagina and increased genital sensation/sensitivity. Orgasm is the release
10 of sexual tension that has culminated during arousal.

Hence, FSD occurs when a woman has an inadequate or unsatisfactory response in any of those phases, usually desire, arousal or orgasm. FSD categories include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorders and sexual pain
15 disorders. Although the compounds of the invention will improve the genital response to sexual stimulation (as in female sexual arousal disorder), in doing so it may also improve the associated pain, distress and discomfort associated with intercourse and so treat other female sexual disorders.

20 Thus, in accordance with a preferred aspect of the invention, there is provided use of a compound of the invention in the preparation of a medicament for the treatment or prophylaxis of hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorder and sexual pain disorder, more preferably for the treatment or prophylaxis of sexual arousal disorder, orgasmic disorder, and sexual pain disorder, and most preferably
25 in the treatment or prophylaxis of sexual arousal disorder.

Hypoactive sexual desire disorder is present if a woman has no or little desire to be sexual, and has no or few sexual thoughts or fantasies. This type of FSD can be caused by low testosterone levels, due either to natural menopause or to surgical menopause.
30 Other causes include illness, medications, fatigue, depression and anxiety.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

- Female sexual arousal disorder (FSAD) is characterised by inadequate genital response to sexual stimulation. The genitalia do not undergo the engorgement that characterises normal sexual arousal. The vaginal walls are poorly lubricated, so that intercourse is painful. Orgasms may be impeded. Arousal disorder can be caused by reduced oestrogen at menopause or after childbirth and during lactation, as well as by illnesses, with vascular components such as diabetes and atherosclerosis. Other causes result from treatment with diuretics, antihistamines, antidepressants e.g. selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) or antihypertensive agents.
- 10 Sexual pain disorders (includes dyspareunia and vaginismus) is characterised by pain resulting from penetration and may be caused by medications which reduce lubrication, endometriosis, pelvic inflammatory disease, inflammatory bowel disease or urinary tract problems.
- 15 The prevalence of FSD is difficult to gauge because the term covers several types of problem, some of which are difficult to measure, and because the interest in treating FSD is relatively recent. Many women's sexual problems are associated either directly with the female ageing process or with chronic illnesses such as diabetes and hypertension.
- 20 Because FSD consists of several subtypes that express symptoms in separate phases of the sexual response cycle, there is not a single therapy. Current treatment of FSD focuses principally on psychological or relationship issues. Treatment of FSD is gradually evolving as more clinical and basic science studies are dedicated to the investigation of this medical problem. Female sexual complaints are not all psychological in
- 25 pathophysiology, especially for those individuals who may have a component of vasculogenic dysfunction (e.g. FSAD) contributing to the overall female sexual complaint. There are at present no drugs licensed for the treatment of FSD. Empirical drug therapy includes oestrogen administration (topically or as hormone replacement therapy), androgens or mood-altering drugs such as buspirone or trazodone. These
- 30 treatment options are often unsatisfactory due to low efficacy or unacceptable side effects.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Since interest is relatively recent in treating FSD pharmacologically, therapy consists of the following: psychological counselling, over-the-counter sexual lubricants, and investigational candidates, including drugs approved for other conditions. These medications consist of hormonal agents, either testosterone or combinations of oestrogen and testosterone and more recently vascular drugs, that have proved effective in male erectile dysfunction (MED). None of these agents has yet been demonstrated to be effective in treating FSD.

As discussed, the compounds of the invention are particularly useful for the prophylaxis and/or treatment of female sexual arousal disorder (FSAD).

The Diagnostic and Statistical Manual (DSM) IV of the American Psychiatric Association defines Female Sexual Arousal Disorder (FSAD) as being:

"... a persistent or recurrent inability to attain or to maintain until completion of the sexual activity adequate lubrication-swelling response of sexual excitement. The disturbance must cause marked distress or interpersonal difficulty. ..."

The arousal response consists of vasocongestion in the pelvis, vaginal lubrication and expansion and swelling of the external genitalia. The disturbance causes marked distress and/or interpersonal difficulty. Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that up to 76% of women have complaints of sexual dysfunction and that 30-50% of women in the USA experience FSD (Berman, J.R., Berman, L.A., Werbin, T.J. *et al.* (1999). Female sexual dysfunction: Anatomy, physiology, evaluation and treatment options. *Curr Opin Urology*, 9, 563-568).

FSAD is a highly prevalent sexual disorder affecting pre-, peri- and post-menopausal (± hormone replacement therapy (HRT)) women. It is associated with concomitant disorders such as depression, cardiovascular diseases, diabetes and urogenital (UG) disorders.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The primary consequences of FSAD are lack of engorgement/swelling, lack of lubrication and lack of pleasurable genital sensation. The secondary consequences of FSAD are reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving an orgasm.

- 5 It has recently been hypothesised that there is a vascular basis for at least a proportion of patients with symptoms of FSAD (Goldstein *et al.*, Int. J. Impot. Res., 10, S84-S90, 1998) with animal data supporting this view (Park *et al.*, Int. J. Impot. Res., 9, 27-37, 1997).

- 10 Drug candidates for treating FSAD, which are under investigation for efficacy, are primarily erectile dysfunction therapies that promote circulation to the male genitalia. They consist of two types of formulation, oral or sublingual medications (Apomorphine, Phentolamine, phosphodiesterase type 5 inhibitors e.g. Sildenafil), and prostaglandin (PGE₁) that are injected or administered transurethrally in men, and topically to the genitalia in women. However, none of these therapies have yet been shown to be
15 effective in the treatment of FSAD.

- Without being bound by theory, we believe that neuropeptides such as vasoactive intestinal peptide (VIP) are major neurotransmitter candidates in the control of the female sexual arousal response, especially in the control of genital blood flow. VIP and other
20 neuropeptides are degraded/metabolised by SEP. Thus, SEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will lead to a prophylaxis and/or treatment of FSAD, such as through enhanced genital blood flow and thence genital engorgement. We have shown that inhibitors of SEP enhance pelvic nerve-stimulated and VIP-induced increases in vaginal and clitoral blood flow. In addition, we
25 have shown that SEP inhibitors enhance VIP and nerve-mediated relaxations of isolated vagina wall.

- Thus the present invention is advantageous as it helps provide a means for restoring a normal sexual arousal response - namely increased genital blood flow leading to vaginal,
30 clitoral and labial engorgement. This will result in increased vaginal lubrication via plasma transudation, increased vaginal compliance and increased genital sensitivity.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Hence, the present invention provides a means to restore, or potentiate, the normal sexual arousal response.

By female genitalia herein we mean: "The genital organs consist of an internal and external group. The internal organs are situated within the pelvis and consist of ovaries, the uterine tubes, uterus and the vagina. The external organs are superficial to the urogenital diaphragm and below the pelvic arch. They comprise the mons pubis, the labia majora and minora pudendi, the clitoris, the vestibule, the bulb of the vestibule, and the greater vestibular glands" (Gray's Anatomy, C.D. Clemente, 13th American Edition).

R.J. Levin teaches us that because "... male and female genitalia develop embryologically from the common tissue anlagen, [that] male and female genital structures are argued to be homologues of one another. Thus the clitoris is the penile homologue and the labia homologues of the scrotal sac. ..." (Levin, R.J. (1991), *Exp. Clin. Endocrinol.*, **98**, 61-69).

MALE ERECTILE DYSFUNCTION (MED)

It is known that some individuals can suffer from male erectile dysfunction (MED).

Male erectile dysfunction (MED) is defined as:

"... the inability to achieve and/or maintain a penile erection for satisfactory sexual performance (NIH Consensus Development Panel on Impotence, 1993) ...".

It has been estimated that the prevalence of erectile dysfunction (ED) of all degrees (minimal, moderate and complete impotence) is 52% in men 40 to 70 years old, with higher rates in those older than 70 (Melman *et al* 1999). The condition has a significant negative impact on the quality of life of the patient and their partner, often resulting in increased anxiety and tension which leads to depression and low self esteem. Whereas two decades ago, MED was primarily considered to be a psychological disorder (Bonot *et al* 1994), it is now known that for the majority of patients there is an underlying organic

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

cause. As a result, much progress has been made in identifying the mechanism of normal penile erection and the pathophysiology of MED.

Penile erection is a haemodynamic event which is dependent upon the balance of contraction and relaxation of the corpus cavernosal smooth muscle and vasculature of the penis (Lerner *et al* 1993). Corpus cavernosal smooth muscle is also referred to herein as corporal smooth muscle or in the plural sense corpus cavernosa. Relaxation of the corpus cavernosal smooth muscle leads to an increased blood flow into the trabecular spaces of the corpus cavernosa, causing them to expand against the surrounding tunica and compress the draining veins. This produces a vast elevation in blood pressure which results in an erection (Naylor, 1998).

The changes that occur during the erectile process are complex and require a high degree of co-ordinated control involving the peripheral and central nervous systems, and the endocrine system (Naylor, 1998). Corporal smooth muscle contraction is modulated by sympathetic noradrenergic innervation via activation of postsynaptic α , adrenoceptors. MED may be associated with an increase in the endogenous smooth muscle tone of the corpus cavernosum. However, the process of corporal smooth muscle relaxation is mediated partly by non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) neurotransmission. There are a number of other NANC neurotransmitters found in the penis, other than nitric oxide (NO), such as calcitonin gene related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP). The main relaxing factor responsible for mediating this relaxation is NO, which is synthesised from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) (Taub *et al* 1993; Chuang *et al* 1998). It is thought that reducing corporal smooth muscle tone may aid NO to induce relaxation of the corpus cavernosum. During sexual arousal in the male, NO is released from neurones and the endothelium and binds to and activates soluble guanylate cyclase (sGC) located in the smooth muscle cells and endothelium, leading to an elevation in intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) levels. This rise in cGMP leads to a relaxation of the corpus cavernosum due to a reduction in the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), via unknown mechanisms thought to involve protein kinase G activation (possibly due to activation of Ca^{2+} pumps and Ca^{2+} -activated K^+ channels; Chuang *et al.*, 1998).

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Sildenafil citrate (also known as ViagraTM) has recently been developed by Pfizer as the first oral drug treatment for MED. Sildenafil acts by inhibiting cGMP breakdown in the corpus cavernosa by selectively inhibiting phosphodiesterase 5 (PDE5), thereby limiting the hydrolysis of cGMP to 5'GMP (Boolel *et al.*, 1996; Jeremy *et al.*, 1997) and thereby increasing the intracellular concentrations of cGMP and facilitating corpus cavernosal smooth muscle relaxation.

Currently, all other available MED therapies on the market, such as treatment with prostaglandin based compounds i.e. alprostadil which can be administered intra-urethrally (available from Vivus Inc., as MuseTM) or via small needle injection (available from Pharmacia & Upjohn, as CaverjectTM), are either inconvenient and/or invasive. Other treatments include vacuum constriction devices, vasoactive drug injection or penile prostheses implantation (Montague *et al.*, 1996). Although injectable vasoactive drugs show high efficacy, side effects such as penile pain, fibrosis and priapism are common, and injection therapy is not as convenient as oral therapy therefore sildenafil currently represents the most preferred therapy on the market.

There is no prior documented evidence for the expression or a functional role of SEP in the penis or corpus cavernosum or in the erectile mechanism/process.

There is also no prior documented evidence for a functional or biochemical effect for SEP inhibitors on the penis or corpus cavernosum or alternatively in the erectile mechanism/process.

There is no prior documented evidence for the expression or a functional role of SEP in the vagina or clitoral corpus cavernosum or in the female sexual arousal mechanism/process.

There is also no prior documented evidence for a functional or biochemical effect for SEP inhibitors in the vagina or clitoral corpus cavernosum or in the female sexual arousal mechanism/process.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Thus, a seminal finding of the present invention is the ability to treat an male or a female suffering from sexual dysfunction, in particular MED or FSAD, with use of a soluble secreted endopeptidase inhibitor (SEPI). Surprisingly the applicants have also found that inhibition of SEP with a SEPI significantly enhances the nerve-stimulated arousal process.

The present invention is advantageous as it provides a means for restoring a normal sexual arousal response - namely increased penile blood flow leading to erection of the penis in males and a increased vaginal clitoral blood flow leading to genital engorgement in females. Hence, the present invention provides a means to restore, or potentiate, the normal sexual arousal response.

References

- 15 Argiolas, A. *et al* (1995). Neuromodulation of penile erection. *Prog Neurobiol.* 47: 235-255.
- Benet, A.E. *et al* (1994). Male erectile dysfunction assessment and treatment options. *Comp. Ther.* 20: 669-673.
- 20 Bodel, M. *et al* (1996). Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br. J. of Urology* 78: 257-261.
- Carter A.I. *et al* (1998). Effect of the selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile dysfunction in the anesthetized dog. *J. Urol.* 160: 242-6.
- Chiou, W.F. *et al* (1998). Relaxation of corpus cavernosum and raised intracavernous pressure by berberine in rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 125: 1677-1684.
- 25 Jeremy, J.Y. *et al* (1997). Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum *in vitro*. *Br. J. Urology* 79: 958-963.
- Lerner, S.B. *et al* (1993). A review of erectile dysfunction: new insights and more questions. *J. Urology* 149: 1246-1255.
- 30 Melman, A. & Gingell, J.C. (1999). The epidemiology and pathophysiology of erectile dysfunction. *J. Urology* 161: 5-11.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

- Montague, D. *et al* (1996). Clinical guidelines panel on erectile dysfunction: Summary report on the treatment of organic erectile dysfunction. *J. Urology* **156**: 2007-2011.
- Naylor, A.M. (1998). Endogenous neurotransmitters mediating penile erection. *Br. J. Urology* **81**: 424-431.
- 5 NIH Consensus Development Panel on Impotence (1993). NIH Consensus Conference *Impotence. J.A.M.A.* **270**: 83.
- Omote M. (1999). Pharmacological profiles of sildenafil (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction: efficacy and drug interaction with nitrate. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **114**:213-8.
- 10 Taub, H.C. *et al* (1993). Relationship between contraction and relaxation in human and rabbit corpus cavernosum. *Urology* **42**: 698-704.
- Traish AM, *et al* (1999). Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology*. **140**: 1861-8.

15

Summary aspects of the invention

In a broad aspect, the present invention relates to novel amino acid sequences. In this regard, a specific novel amino acid sequence has been identified and it is to be understood

20 that the invention covers that sequence as well as novel variants, fragments, derivatives and homologues thereof.

In another broad aspect, the present invention relates to novel nucleic acid sequences. In this regard, a specific novel nucleic acid sequence has been identified and it is to be

25 understood that the invention covers that sequence as well as novel variants, fragments, derivatives and homologues thereof.

Thus, in brief, some aspects of the present invention relate to:

- 30 1. Novel amino acids.
2. Novel nucleotide sequences.
3. Assays using said novel sequences.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

4. Compounds/compositions identified by use of said assays.
5. Expression systems comprising or expressing said novel sequences.
6. Methods of prophylaxis and/or treatment based on said novel sequences.
7. Pharmaceutical compositions based on said novel sequences.

5

Other aspects concerning the amino acid sequence of the present invention and/or the nucleotide sequence of the present invention include: a construct comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a vector comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a plasmid comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a tissue comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; an organ comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; a transformed host comprising or capable of expressing the sequences of the present invention; and a transformed organism comprising or capable of expressing the sequences of the present invention. The present invention also encompasses methods of expressing the same, such as expression in a micro-organism; including methods for transferring the same.

In the following commentary references to "nucleotide sequence of the present invention" and "amino acid sequence of the present invention" refer respectively to any one or more of the nucleotide sequences presented or discussed herein and to any one or more of the amino acid sequences presented or discussed herein. Also, and as used herein, "amino acid sequence" refers to peptide or protein sequences and may refer to portions thereof. In addition, the term "amino acid sequence of the present invention" is synonymous with the phrase "polypeptide sequence of the present invention". Also, the term "nucleotide sequence of the present invention" is synonymous with the phrase "polynucleotide sequence of the present invention".

Detailed aspects of the invention

30

According to one aspect of the present invention, there is provided an isolated and/or purified polynucleotide comprising one or more of:

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

- (a) a polynucleotide encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2;
- (b) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5;
- 5 (c) a polynucleotide encoding the polypeptide expressed by the DNA contained in NCIMB 41110;
- (d) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 83% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c);
- (e) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is capable of
- 10 hybridising to the polynucleotide of any one of (a) to (d);
- (f) a complement to the polynucleotide of any one of (a) to (e); or
- (g) a polynucleotide fragment of the polynucleotide of any one of (a) to (f).

For the polypeptide of SEQ ID NO: 2, any one or more of the amino acids may be an
 15 analogue thereof.

The term "analogue" as used herein means a sequence having a sequence similar to that of
 SEQ ID NO: 2 but wherein non-detrimental (i.e. not detrimental to enzymatic activity)
 amino acid substitutions or deletions have been made.

20 Preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 85% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c) above. More preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 87% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c) above. Even more preferably, the polynucleotide
 25 comprises a nucleotide sequence that has at least 89% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c) above. Yet more preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 90% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c) above. Most preferably, the polynucleotide comprises a nucleotide sequence that has at least 95% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c) above.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Preferably, the polynucleotide described above encodes a polypeptide which comprises the amino acid sequence MGKSEGPVG. Preferably said amino acid sequence MGKSEGPVG is at or near the amino terminus of the polypeptide.

5 Preferably, the polynucleotide described above comprises the nucleotide sequence ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCCGTGGGG. Preferably said nucleotide sequence ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCCGTGGGG is at or near the 5' end of the polynucleotide.

10 The polynucleotide described above preferably encodes a soluble secreted endopeptidase (SEP), preferably human SEP.

The present invention also provides a polynucleotide probe or primer comprising at least 15 contiguous nucleotides of the polynucleotide described above, or the complement thereof. Preferably, the probe or primer can specifically distinguish said SEP coding sequence from other sequences.

The present invention yet further provides a vector comprising the polynucleotide described above.

20

According to a further aspect of the present invention, there is provided a host cell transformed or transfected with the vector described above. Preferably, the host cell is a mammalian, bacterial or yeast cell.

25 Further provided by the present invention is the transcribed RNA product of the polynucleotide described above.

Also provided by the present invention is an RNA molecule or a fragment thereof which is antisense in relation to said RNA product described above and is capable of hybridising thereto.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

A ribozyme or zinc finger protein capable of binding to the polynucleotide described above is also provided by the present invention.

According to yet a further aspect of the present invention, there is provided a process for producing a polypeptide or fragment thereof comprising transforming or transfecting a host cell with the vector described above and culturing said transformed/transfected host cell in culture medium under conditions sufficient for the expression of said polypeptide or fragment. Preferably, said polypeptide or fragment is secreted into the culture medium. The process preferably further includes recovering the polypeptide or fragment from the culture.

There is also provided by the present invention a process for producing cells capable of expressing a polypeptide or fragment thereof comprising transforming or transfecting cells with the vector described above.

According to a further embodiment of the present invention, there are provided cells produced by the process described above. There is also provided the polypeptide or fragment thereof as described above produced by the above process.

According to another aspect of the present invention, there is provided a polypeptide having SEP activity comprising one or more of:

- (a) a polypeptide having the deduced amino acid sequence translated from the polynucleotide sequence in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof;
- (b) a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof;
- (c) a polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41110 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof; or
- (d) a polypeptide which has at least 78% identity to (i) the polypeptide encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5, (ii) the

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

polypeptide of SEQ ID NO: 2, or (iii) the polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41110.

5 Preferably, the polypeptide comprises a polypeptide sequence that has at least 85%, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, most preferably at least 98% identity to (i) the polypeptide encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5, (ii) the polypeptide of SEQ ID NO: 2, or (iii) the polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41110.

10 Preferably, the polypeptide described above comprises the amino acid sequence MGKSEGPVG. Preferably said amino acid sequence MGKSEGPVG is at or near the amino terminus of the polypeptide.

15 Preferably, the polynucleotide which encodes the polypeptide described above comprises the nucleotide sequence ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCGTGGG. Preferably said nucleotide sequence ATGGGGAAGTCCGAAGGCCCGTGGG is at or near the 5' end of the polynucleotide.

20 There is also provided by the present invention an antibody against the polypeptide described above.

The present invention yet further provides a compound, which modulates the polypeptide described above. Preferably, the compound inhibits or selectively inhibits the polypeptide.

25 Also provided by the present invention is a pharmaceutical composition comprising the antibody or compound described above and one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents or excipients.

30 According to another aspect of the present invention, there is provided a method for identifying a candidate modulator, which binds to and/or modulates the polypeptide

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

described above comprising contacting said polypeptide with a candidate modulator and determining whether modulation occurs.

Preferably, said method comprises:

5

- (a) contacting (i) a substrate peptide of the polypeptide described above with (ii) the polypeptide described above, in the presence of (iii) a candidate modulator of the polypeptide described above, wherein said substrate peptide is capable of providing a detectable signal in response to cleavage of said substrate peptide by the polypeptide described above; and
- (b) determining whether the cleavage of said substrate peptide by the polypeptide described above has been modulated or not by said candidate modulator by detecting the presence or absence of said detectable signal associated with said substrate peptide.

15

Preferably, said candidate modulator is a candidate inhibitor. More preferably, said substrate peptide is labelled with at least one fluorescent donor dye and at least one fluorescent acceptor dye and the assay used to detect candidate inhibitors of the polypeptide described above is a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay.

20

Most preferably, said labelled substrate peptide is Rhodamine green-Gly-Gly- α -Phe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSYTM-7)- β -Ala-NH₂.

Thus, according to a preferred aspect of the present invention, there is provided a method for identifying a candidate inhibitor which binds to and/or inhibits the polypeptide

25

described above, which comprises:

30

- (a) contacting (i) a substrate peptide of the polypeptide described above with (ii) the polypeptide described above, in the presence of (iii) a candidate inhibitor of the polypeptide described above, wherein said substrate peptide is capable of providing a detectable signal in response to cleavage of said substrate peptide by the polypeptide described above; and
- (b) determining whether the cleavage of said substrate peptide by the

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

polypeptide described above has been inhibited or not by said candidate inhibitor by detecting the presence or absence of said detectable signal associated with said substrate peptide.

5 Preferably, said substrate peptide is labelled with at least one fluorescent donor dye and at least one fluorescent acceptor dye and the assay used to detect candidate inhibitors of the polypeptide described above is a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay. Most preferably, said labelled substrate peptide is Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY™-7)-βAla-NH₂.

10

The SEP FRET assay is based on an assay developed by Carvalho *et al.* for use with NEP (Carvalho *et al.*, *Annal. Biochem.* 237, pp. 167-173 (1996)). The SEP FRET assay utilises a similar intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrate, but with a novel combination of fluorogenic donor/acceptor dyes, specifically Rhodamine green

15

(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) and QSY™-7 (abbreviated hereafter as "QSY-7" or "QSY7"; Molecular Probes, Inc.).

The preparation of the synthetic labelled substrate peptide Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)-βAla-NH₂ is detailed in the Experimental section

20

(*infra*).

According to an alternative aspect of the present invention, there is provided a method for identifying a candidate modulator, which binds to and/or modulates the polypeptide described above comprising contacting said polypeptide with a candidate modulator and

25

determining whether modulation occurs; wherein said method comprises:

- (a) contacting a candidate modulator with cells secreting the polypeptide described above, said polypeptide being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the

30

binding of a candidate modulator to said polypeptide; said contacting being under conditions sufficient to permit binding of candidate modulators to the polypeptide; and

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

- (b) identifying a candidate modulator capable of polypeptide binding by detecting the signal produced by said second component.

In addition, said method comprises:

5

- (a) contacting (i) a detectable first component known to bind to the polypeptide described above and (ii) a candidate modulator, with cells secreting the above polypeptide, said polypeptide being associated with a second component capable of providing a detectable signal in response to the binding of a candidate modulator to said polypeptide; said contacting being under conditions sufficient to permit binding of candidate modulators to the polypeptide; and
- (b) determining whether the first component binds to the polypeptide by detecting the absence or otherwise of a signal generated from the interaction of the first component with the polypeptide.

The candidate modulator identified by any of the above methods preferably binds to and/or inhibits the polypeptide described above, i.e. is preferably a candidate inhibitor.

20 In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent (hereinafter referred to as a SEP inhibitor or SEPI) that can be used to treat female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED, the assay method comprising: determining whether a test agent can directly enhance the endogenous genital engorgement process or erectile process; wherein said enhancement is

25 defined as a potentiation of genital blood flow or intracavernosal pressure (ICP) (and/or cavernosal blood flow) in the presence of a test agent as defined herein; such potentiation by a test agent is indicative that the test agent may be useful in the prophylaxis and/or treatment of female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED and wherein said test agent is a SEPI.

30

By way of example, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly enhance the endogenous genital arousal or erectile process in order to

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

treat female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED, the assay method comprising: contacting a test agent which has a moiety capable of inhibiting the metabolic breakdown of a peptide (preferably a fluorescent labelled peptide, such as Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)- β Ala-NH₂), said peptide being normally metabolised by SEP; and measuring the activity and/or levels of peptide remaining after a fixed time (for example via fluorometric analysis); wherein the change in the level of the peptide measured by fluorescence is indicative of the potency (IC₅₀) of the test agent and is indicative that the test agent may be useful in the prophylaxis and/or treatment of female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED; and wherein said agent is a SEPi.

In a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a) performing the assay according to the present invention; (b) identifying one or more agents that can directly enhance the endogenous genital arousal process or erectile process; and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents; and wherein said agent is a SEPi.

With this aspect, the agent identified in step (b) may be modified so as to, for example, maximise activity and then step (a) may be repeated. These steps may be repeated until the desired activity or pharmacokinetic profile has been achieved.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a1) performing the assay according to the present invention; (b1) identifying one or more agents that can directly enhance the endogenous genital arousal process or erectile process; (b2) modifying one or more of said identified agents; (a2) optionally repeating step (a1); and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents (i.e. those that have been modified); and wherein said agent is a SEPi.

It is to be understood that any candidate modulator, candidate inhibitor, candidate selective inhibitor, agent (hereinafter referred to as a SEP inhibitor or SEPi), etc. that is identified using any assay (or modification thereof) described above is also deemed an aspect of the present invention.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Thus, the present invention provides a candidate modulator, candidate inhibitor, candidate selective inhibitor or agent identified by any one of the methods (assays) described above.

- 5 As endopeptidases are involved in, *inter alia*, regulating bioactive peptide activity (e.g. peptidergic signalling processes), modulators (e.g. inhibitors, including selective inhibitors) of endopeptidases can find use in modulating such activity.

- Some endopeptidases, such as ECE-1, are involved in proteolysis of biologically inactive peptides into their active form. Therefore, modulators (e.g. inhibitors, including selective inhibitors) of endopeptidases can find use in modulating such activity.

Human SEP may therefore be involved in regulating bioactive peptide activity and/or in proteolysis of biologically inactive peptides into their active form.

- 15 Consequently, the present invention provides an antibody, compound or composition which modulates the polypeptide described above for use as a pharmaceutical. Such antibodies, compounds or compositions, which can act as inhibitors or selective inhibitors of the polypeptide, can therefore find use in the therapeutic areas that concern aspects of regulating bioactive peptide activity, such as modulating peptidergic signalling processes and/or in proteolysis of biologically inactive peptides into their active form. Such therapeutically usefully areas include, but are not limited to, sexual dysfunction (e.g. female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED), fertility disorders, neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and stroke, cardiovascular diseases such as hypertension, wound healing/tissue repair, etc.

Accordingly, there is also provided the antibody, compound or composition described above for use as a pharmaceutical.

- 30 There is also provided the use of the above compound in the manufacture of a medicament in the prophylaxis and/or treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

There is also provided the use of the above compound in the manufacture of a medicament in the prophylaxis and/or treatment of a patient having need to inhibit or selectively inhibit the polypeptide described above. Preferably, said use of the above
5 compound is in the manufacture of a medicament for the prophylaxis and/or treatment of sexual dysfunction. More preferably, said sexual dysfunction is male erectile dysfunction (MED) or female sexual dysfunction (FSD). Most preferably, said female sexual dysfunction (FSD) is female sexual arousal disorder (FSAD).

10 According to yet a further aspect of the invention, there is provided a method for the prophylaxis and/or treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the above-described compound.

15 There is also provided a method for the prophylaxis and/or treatment of a patient having need to inhibit or selectively inhibit the polypeptide described above comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the above-described compound.

20 There is yet further provided a method for the prophylaxis and/or treatment of sexual dysfunction in a patient comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the above-described compound. Preferably, said sexual dysfunction is male erectile dysfunction (MED) or female sexual dysfunction (FSD). More preferably, said female sexual dysfunction (FSD) is female sexual arousal disorder (FSAD).

25 Preferably, said compound is a polypeptide and a therapeutically effective amount of the compound is administered by providing to the patient DNA encoding said compound and expressing said compound *in vivo*. More preferably, the compound is a polypeptide inhibitor and the modulation is inhibition or selective inhibition of the polypeptide
30 described above.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Further provided by the present invention is use of the antibody described above in the manufacture of a medicament for the prophylaxis and/or treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above. Preferably, said modulation is inhibition or selective inhibition of the polypeptide described above. Preferably, said
5 prophylaxis and/or treatment is for sexual dysfunction. More preferably, said sexual dysfunction is male erectile dysfunction (MED) or female sexual dysfunction (FSD). Most preferably, said female sexual dysfunction (FSD) is female sexual arousal disorder (FSAD).

10 There is also provided by the present invention a method for the prophylaxis and/or treatment of a patient having need to modulate the polypeptide described above, comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antibody described above. Preferably, said modulation is inhibition or selective inhibition of the polypeptide described above. Preferably, said prophylaxis and/or treatment is for sexual
15 dysfunction. More preferably, said sexual dysfunction is male erectile dysfunction (MED) or female sexual dysfunction (FSD). Most preferably, said female sexual dysfunction (FSD) is female sexual arousal disorder (FSAD).

A preferred aspect of the present invention relates to SEPI compounds and pharmaceutical compositions including SEPI compounds for use (or when in use) in the prophylaxis and/or treatment of female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED. In said pharmaceutical compositions the SEPI is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. Here, the composition (like any of the other compositions mentioned herein) may be
25 packaged for subsequent use in the prophylaxis and/or treatment of male sexual dysfunction, in particular MED, or female sexual dysfunction, in particular FSAD.

In another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the prophylaxis and/or
30 treatment of female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from female sexual dysfunction, in particular FSAD, or a male suffering from male sexual dysfunction, in particular MED; the method comprising delivering to the female or male a SEPI that is capable of enhancing the endogenous genital arousal/engorgement response in the clitoris and vagina or erectile process in the corpus cavernosum; wherein the SEPI is present in an amount to enhance the endogenous arousal/erectile process as defined hereinbefore; wherein the SEPI is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said SEPI is as herein defined.

10 In a further aspect, the present invention relates to a method of treating female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED, by potentiating the nerve stimulated endogenous genital arousal process or erectile process *in vivo* (e.g. in rabbit) by measuring the vaginal/clitoral blood flow, ICP or cavernosal blood flow with an agent; wherein the agent is capable of directly inhibiting the metabolic breakdown of a fluorescent peptide (as mentioned hereinbefore and as detailed hereinafter) in an *in vitro* assay method; wherein the *in vitro* assay method is the assay method according to the present invention; and wherein said agent is a SEPI.

In a further aspect, the present invention relates to the use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the prophylaxis and/or treatment of female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED, wherein the agent is capable of directly inhibiting the metabolic breakdown of a fluorescent peptide when assayed *in vitro* by the assay method according to the present invention; and wherein said agent is a SEPI.

25 Preferably, the SEP inhibitors (SEPI) for use in the prophylaxis and/or treatment of male and female sexual dysfunction, in particular MED and FSAD, according to the present invention have an IC_{50} at less than 100 nanomolar, more preferably, at less than 50 nanomolar.

30 Preferably, the SEP inhibitors according to the present invention have greater than 30-fold, more preferably greater than 50-fold selectivity for SEP over neutral

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

endopeptidase NEP EC 3.4.24.11 and angiotensin converting enzyme (ACE). This reduces the prospect of cardiovascular events (e.g. drop in blood pressure) when the SEPi is administered systemically (e.g. by mouth). Preferably the SEPi also has a greater than 100-fold selectivity over endothelin converting enzyme (ECE).

5

SEPi compounds are prepared according to the teachings presented in the Experimental section (*infra*). They are tested as agents and are found to be useful for enhancing the endogenous erectile process, and thereby being useful in the prophylaxis and/or treatment of MED and FSAD.

10

Without being limited to any particular theory it is proposed herein that by inhibiting SEP, other neuronally released vasoactive agents (most likely vasoactive intestinal protein (VIP)), that are released during sexual arousal, are enhanced. It is believed that use of the SEPi potentiates the effects of neuropeptides (most likely VIP) that are released during sexual stimulation, and hence potentiates the male erectile mechanism by increasing cavernosal blood flow and thus intracavernosal pressure and female engorgement by increasing genital blood flow.

15

It is further proposed that the use of the compounds according to the present invention acts via enhancing a non-NO-dependant NANC pathway to treat MED and FSAD, and to potentiate or facilitate the nitergic signalling in the penis and vagina/clitoris.

20

Thus according to a preferred aspect of the invention, there is provided the use of a SEPi by systemic administration (preferably by mouth e.g. swallowable tablet or capsule, or a sublingual or buccal formulation) in the preparation of a medicament for the prophylaxis and/or treatment of male sexual dysfunction, in particular MED, or female sexual dysfunction, in particular FSAD.

25

In our studies we have developed a robust reproducible model of the physiology of male and female sexual arousal. This model uses an anaesthetised rabbit and employs Laser Doppler technologies to monitor intracavernosal pressure and genital blood flow whilst routinely recording cardiovascular parameters. We are capable of measuring small

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

changes in intracavernosal pressure within the penis and vaginal (and even clitoral) blood flow induced by pelvic nerve stimulation or infusion of VIP in the absence and presence of test agents.

5 We believe that our animal model directly reflects the clinical data. Hence, this model can be used to study candidate agents for the prophylaxis and/or treatment of e.g. MED and FSAD, such as measuring enhancement of penile erection via increases in intracavernosal pressure and enhancement vaginal or clitoral blood flow.

10 Thus, according to a further aspect, the present invention relates to an animal model used to identify agents capable of treating female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED, said model comprising an anaesthetised female or male animal including means to measure changes in vaginal/clitoral blood flow, intracavernosal pressure and/or cavernosal blood flow of said animal following
15 stimulation of the pelvic nerve thereof; and wherein said agent is a SEPI.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly enhance the endogenous genital arousal process or erectile process in order to treat FSAD or MED, the assay method comprising: administering an agent to the
20 animal model of the present invention; and measuring the change in the endogenous genital arousal process or erectile process; wherein said change is defined as a potentiation of vaginal/clitoral blood flow, intracavernosal pressure (ICP) (and/or cavernosal blood flow) in the animal model in the presence of a test agent as defined; and wherein said agent is a SEPI.

25 In a further aspect, the present invention relates to a diagnostic method, the method comprising isolating a sample from a female or male; determining whether the sample contains an entity present in such an amount as to cause female sexual dysfunction, preferably FSAD, or male sexual dysfunction, preferably MED; wherein the entity has a
30 direct effect on the endogenous genital arousal process in the female or erectile process in the corpus cavernosum of the male; and wherein said entity can be modulated to achieve a beneficial effect by use of an agent; and wherein said agent is a SEPI.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

In a further aspect, the present invention relates to a diagnostic composition or kit comprising means for detecting an entity in an isolated female or male sample; wherein the means can be used to determine whether the sample contains the entity and in such an amount to cause female sexual dysfunction, preferably FSAD, or male sexual dysfunction, preferably MED, or is in an amount so as to cause sexual dysfunction, preferably FSAD or MED; wherein the entity has a direct effect on the endogenous genital arousal process or erectile process and wherein said entity can be modulated to achieve a beneficial effect by use of an agent; and wherein said agent is a SEPI.

According to yet a further aspect of the present invention, there are provided cells genetically engineered *ex vivo* or *in vivo* to overexpress, underexpress or to exhibit targeted insertion or deletion of the polypeptide of the present invention. Preferably, said cells genetically engineered *in vivo* are comprised within a non-human animal.

The present invention also provides cells deposited under Accession Number NCIMB 41110 and variants and mutants derivable therefrom capable of producing the polypeptide described above.

Also provided by the present invention is a method of elucidating the three-dimensional structure of the polypeptide described above, comprising the steps of: (a) purifying the polypeptide; (b) crystallising it, and (c) elucidating the structure, in particular by X-ray crystallography.

In a further aspect, the present invention also relates to a method of modelling the structure of the polypeptide described above, comprising the steps of: (a) aligning the sequence with a sequence of a protein of known three-dimensional structure, in particular rhodopsin; (b) mapping the detected sequence differences of the polypeptide described above onto the known structure, (c) deriving a homology model of the polypeptide described above.

For ease of reference, these and further aspects of the present invention are now discussed

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

under appropriate section headings. However, the teachings under each section are not necessarily limited to each particular section.

HUMAN SEP ENZYME

5

As explained above, the present invention relates to a novel endopeptidase enzyme - which has been designated human soluble secreted endopeptidase (human SEP) - and to a nucleotide sequence encoding same. The present invention also relates to the use of the novel nucleic acid and amino acid sequences in the diagnosis and prophylaxis and/or treatment of disease. The present invention also relates to the use of the novel nucleic acid and amino acid sequences to evaluate and/or to screen for agents that can modulate (preferably inhibit or selectively inhibit) endopeptidase activity. The present invention further relates to genetically engineered host cells that comprise or express the novel nucleic acid and amino acid sequences to evaluate and/or to screen for agents that can modulate (preferably inhibit or selectively inhibit) endopeptidase activity.

10
15

Human SEP is believed to be present in, and obtainable from, a variety of sources.

By way of example, human SEP is found in any one or more of the cardiovascular system, the neurological system, the endocrine system and the testis.

20

We also believe that SEP is also present in a number of other sources - such as, for example: rodent (murine (Ikeda *et al.*, Journal Biological Chemistry, Vol 274, 1999, pp. 32469-32477) and rat (NEP II - International Patent Application WO 99/53077)), bovine, ovine, porcine, and equine.

25

The human SEP may be the same as the naturally occurring form - for this aspect, preferably the human SEP is the non-native amino acid sequence (i.e. it is not present in its natural environment) - or is a variant, homologue, fragment or derivative thereof. In addition, or in the alternative, the human SEP is isolated human SEP and/or purified human SEP. The human SEP can be obtainable from, or produced by, any suitable source, whether natural or not, or it may be synthetic, semi-synthetic or recombinant.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The human SEP coding sequence may be the same as the naturally occurring form - for this aspect, preferably the human SEP coding sequence is the non-native nucleotide sequence (i.e. it is not present in its natural environment) - or is a variant, homologue, fragment or derivative thereof. In addition, or in the alternative, the human SEP coding sequence is an isolated human SEP coding sequence and/or a purified human SEP coding sequence. The human SEP coding sequence can be obtainable from, or produced by, any suitable source, whether natural or not, or it may be synthetic, semi-synthetic or recombinant.

10

HUMAN SEP ACTIVITY AND SCREENING

Human SEP and/or its coding sequence and/or a sequence capable of hybridising thereto is/are useful for testing the selectivity of drug candidates between different SEPs.

15

Human SEP is believed to be able to hydrolyse (proteolyse) various bioactive peptides.

It has been demonstrated (herein) that human SEP mRNA is most abundant in the testis compared to other tissues. This is in line with data published for mouse SEP (Ghaddar *et al.*, Biochemical Journal, Vol 347, 2000, pp. 419-429), where the mRNA has been further localised to round and elongated spermatids.

20

Multiple different proteolytic activities have been identified in the testis previously, and in some cases they have been shown to be essential for testis function (e.g. ACE activity). It is likely from its abundance in this tissue that one possible physiological role of SEP will be related to a function of the testis (e.g. fertility).

25

Human SEP may hydrolyse a particular physiologically important biological peptide within the testis that is involved in an aspect of fertility or another function of the testis to either activate, or inactivate the peptide. The exact nature of this (predicted) physiological peptide has yet to be determined. However SEP can hydrolyse many biological peptides including big-endothelin, endothelin-1, angiotensin-I, substance P, bradykinin,

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

enkephalins, and atrial natriuretic peptide (ANP). Several of these are known to function in the testis. Endothelin-1, for example, is found in the testis where it is involved in promoting seminiferous tubule contractility. Interestingly, the enzyme activity (ECE) detected within the testis that is thought to generate the endothelin-1 from big-endothelin is sensitive to the inhibitors phosphoramidon and thiorphan. Since mouse SEP and most probably human SEP are also sensitive to these inhibitors, this activity may be related to SEP rather than ECE. Compounds that inhibit human SEP activity may therefore lead to altered (increased or decreased) levels of endothelin within the testis, and this could potentially be useful for the prophylaxis and/or treatment of infertility or as a male contraceptive.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is another potential human SEP substrate that plays a role in the testis. VIP has been shown to increase blood flow in the testis and also to promote testicular steroidogenesis, as well as human sperm motility (Siow et al, Archives of Andrology, Vol 43, 1999, p. 6771). It is possible that drugs inhibiting human SEP activity could be useful in modulating VIP levels in the testis and hence testicular bloodflow, steroidogenesis or sperm motility.

Although human SEP mRNA is most abundant in testis, it can also be detected at lower levels in a variety of tissues using the sensitive method of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). In the mouse, SEP has been detected in heart, brain, spleen, lungs, kidney, intestine, and adrenal gland. The cDNA library screening approach that was used herein to isolate the full length human SEP cDNA sequence also identified human SEP cDNAs in libraries derived from human brain, placenta, small intestine and kidney tissue.

Human SEP enzyme can also be secreted from the cell. It is likely therefore that the human SEP protein, in addition to being abundant in the testis, will also be found at moderate levels in a wide range of other tissues throughout the body. In these tissues it is likely that human SEP will hydrolyse the biological peptide substrates mentioned above.

Drugs that inhibit the enzyme activity of SEP will therefore be likely to lead to changes in

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

the levels of many of the human SEP substrates mentioned above in a variety of different tissues. As these human SEP substrates are usually biologically active molecules or their precursors which are often associated with peptidergic signalling processes, it is likely that human SEP inhibitors may be useful for the prophylaxis and/or treatment of many different disorders associated with peptidergic signalling that will most likely include, but is not limited to, sexual dysfunction (e.g. female sexual dysfunction, in particular FSAD, or male sexual dysfunction, in particular MED) and reproductive disorders, as well as other diseases/disorders such as neurodegenerative disorders (e.g. Alzheimer's disease and stroke), and cardiovascular diseases such as hypertension, etc.

Thus, human SEP and/or its coding sequence and/or a sequence capable of hybridising thereto may be useful for screening drug candidates for the prophylaxis and/or treatment of diseases associated with peptidergic signalling. In addition, it is believed that human SEP and/or its coding sequence and/or a sequence capable of hybridising thereto may be useful for screening drug candidates for the prophylaxis and/or treatment of diseases such as those described above.

Either or both of the nucleotide sequences coding for human SEP or the human SEP enzyme itself may be used to screen for agents that can affect SEP activity. In particular, the nucleotide sequence coding for human SEP itself may be used to screen for agents that can inhibit SEP activity. In addition, the nucleotide sequence coding for human SEP or the human SEP enzyme itself may be used to screen for agents that selectively affect SEP activity, such as selectively inhibit SEP activity.

25 MEASUREMENT OF HUMAN SEP ACTIVITY - HUMAN SEP ASSAYS

The enzymatic (proteolytic) activity of human SEP protein can be measured in an assay involving, for example, mixing a sample of the human SEP enzyme with a substrate peptide in a buffer solution (for example 50mM HEPES; pH 7.4), incubating the mixture for a period of time (such as 1-3 hours) enough for human SEP to act to cleave a measurable portion of the peptide substrate to a product at a temperature suitable for SEP activity (typically 30-37°C). Thereafter, the substrate and/or products of the proteolysis

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

can be analysed to demonstrate that the substrate has been cleaved by the SEP enzyme.

The effect of candidate human SEP inhibitor compounds or control test compounds such as phosphoramidon and thiorphan that may alter the activity of human SEP can be measured in this type of assay by including them in the initial mixture at a range of suitable test concentrations, typically 0.1nM to 50µM.

Samples of SEP enzyme suitable for use in the above type of assay can be produced using a recombinant expression system. This will typically involve introducing an expression plasmid containing the human SEP cDNA or gene (e.g. the expression vector obtainable from NCIMB 41110) into a host organism or cell where the human SEP protein is then expressed. SEP protein may be released (i.e. secreted extracellularly) from the host into the growth media (e.g. if artificially expressed in mammalian cells), or retained in the cell (e.g. if artificially expressed in yeast or insect cells - where possible improper expression could result in the failure of human SEP to be secreted from the cell, therefore necessitating isolation from its intracellular location). Typically the host can be a yeast, insect cell, mammalian cell, or bacteria. The SEP enzyme can then be recovered from the culture media or host cell (e.g. by lysing the cells) which may necessitate using protein purification methods.

Human SEP enzyme for the aforementioned assay may also be purified from a suitable tissue source (if a sufficient quantity is obtainable). This tissue can include testis or brain.

Substrates suitable for use in the human SEP assay can be any peptide that SEP is able to cleave at a rate which is measurable in a useful period of time, e.g. 5 hours. Such substrate peptides can include, but are not limited to, peptides which are the same as, or similar to, biological peptides such as enkephalin, VIP, bradykinin, substance P, big endothelin, endothelin, angiotensin-I or ANP. The peptide can be modified to include a fluorescent, coloured, radioactive, or other chemical group that will facilitate measurement of the substrate and/or products before, during, or after the assay.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Preferred substrates suitable for use in the human SEP assay are SEP-cleavable synthetic peptides labelled with at least one fluorescent donor dye and at least one fluorescent acceptor dye and the assay used to detect inhibition of said SEP cleavage (proteolysis) is a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay. Most preferably, said labelled
 5 substrate peptide is a small fluorogenic peptide, preferably Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)-βAla-NH₂.

Such a FRET-based SEP assay is based on an assay developed by Carvalho *et al.* for use with NEP (Carvalho *et al.*, *Annal. Biochem.* 237, pp. 167-173 (1996)). The SEP FRET
 10 assay utilises a similar intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrate, but with a novel combination of fluorogenic donor/acceptor dyes, specifically Rhodamine green (Molecular Probes, Inc.) and QSY7 (Molecular Probes, Inc.).

The preparation of the synthetic labelled substrate peptide Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)-βAla-NH₂ is detailed in the Experimental section
 15 (*infra*).

Suitable buffers for use in human SEP assays can be any in which human SEP is found to be active and that does not otherwise interfere with the end result of the assays. Normally
 20 this will be a buffer that maintains a neutral pH. An example of such a buffer is 50mM Tris Cl; pH 7.4. However, such a buffer is not preferred for use in a human SEP FRET assay as Tris is very prone to changes in pH due to temperature fluctuations. Therefore, a preferred buffer for use in a human SEP FRET assay is 50mM HEPES; pH 7.4.

The method of measurement of the substrate and/or products in the human SEP assay will depend on the peptide substrate chosen and the nature of its modification. For example, if
 25 the substrate chosen contains a fluorescent group, a fluorimeter can be used. Similarly, if the substrate is radiolabelled, a scintillation counter may be used. Most substrates and products can be measured using high pressure liquid chromatography (HPLC) or mass
 30 spectrometry, and these would be the methods of choice if the substrate was not modified to include a radiolabel or fluorescence label.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Furthermore, the nucleotide sequence coding for human SEP or a sequence that is complementary thereto may also be used in assays to detect the presence of human SEP coding sequences in human cells. These assays would provide information regarding the tissue distribution of this enzyme and its biological relevance with respect to particular disease states.

The present invention also covers antibodies to human SEP (including a derivative, fragment, homologue or variant thereof). The antibodies for human SEP may be used in assays to detect the presence of human SEP in human cells. These assays would provide information regarding the tissue distribution of this enzyme and its biological relevance with respect to particular disease states.

The present invention also covers splice variants (isoenzymes) of the human SEP sequence. In particular, any one or more of the human SEP isoenzymes, the nucleotide sequences coding for same, the nucleotide sequences that are complementary to same, and the antibodies directed to same may be used in assays to screen for agents that selectively affect one of the isoenzymes. These assays would provide information regarding the tissue distribution of each of the isoenzymes and to provide information regarding the biological relevance of each of the isoenzymes with respect to particular disease states. These assays would also allow one of skill in the art to test for and identify agents that are useful to affect the expression of or activity of human SEP - such as in a particular tissue or in a particular disease state.

POLYPEPTIDE OF THE PRESENT INVENTION

The term "polypeptide" - which is interchangeable with the term "protein" - includes single-chain polypeptide molecules as well as multiple-polypeptide complexes where individual constituent polypeptides are linked by covalent or non-covalent means.

Preferably, the polypeptide of the present invention is a single-chain polypeptide.

Polypeptides of the present invention may be in a substantially isolated form. It will be

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

understood that the polypeptide may be mixed with carriers or diluents which will not interfere with the intended purpose of the polypeptide and still be regarded as substantially isolated. A polypeptide of the present invention may also be in a substantially purified form, in which case it will generally comprise the polypeptide in a preparation in which more than 90%, e.g. 95%, 98% or 99% of the polypeptide in the preparation is a polypeptide of the present invention. Polypeptides of the present invention may be modified for example by the addition of histidine residues to assist their purification.

10 Polypeptides of the present invention may be produced by synthetic means (e.g. as described by Geysen *et al.*, 1996) or recombinantly, as described below.

In a preferred embodiment, the amino acid sequence *per se* of the present invention does not cover the native human SEP according to the present invention when it is in its natural environment and when it has been expressed by its native nucleotide coding sequence which is also in its natural environment and when that nucleotide sequence is under the control of its native promoter which is also in its natural environment. For ease of reference, we have called this preferred embodiment the "non-native amino acid sequence".

20 The terms "variant", "homologue", "derivative" or "fragment" in relation to the amino acid sequence for the enzyme of the present invention include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) amino acid from or to the sequence providing the resultant enzyme has SEP activity, preferably being at least as biologically active as the enzyme shown in attached SEQ ID NO: 2. In particular, the term

25 "homologue" covers homology with respect to structure and/or function. With respect to sequence homology, preferably there is at least 78%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90% homology to the sequence shown in SEQ ID NO: 2. More preferably there is at least 95%, more preferably at least 98%, homology to the sequence shown in SEQ ID NO: 2.

30 Typically, for the variant, homologue, derivative or fragment of the present invention, the types of amino acid substitutions that could be made should maintain the

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

hydrophobicity/hydrophilicity of the amino acid sequence. Amino acid substitutions may be made, for example from 1, 2 or 3 to 10, 20 or 30 substitutions provided that the modified sequence retains the ability to act as a SEP enzyme in accordance with present invention. Amino acid substitutions may include the use of non-naturally occurring analogues, for example to increase blood plasma half-life.

The amino acid sequence of the present invention may be produced by expression of a nucleotide sequence coding for same in a suitable expression system.

10 In addition, or in the alternative, the protein itself could be produced using chemical methods to synthesize a human SEP amino acid sequence, in whole or in part. For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g. Creighton (1983) *Proteins Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, NY, USA). The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g. the Edman degradation procedure).

Direct peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (Roberge *et al*, *Science*, Vol 269, 1995, pp. 202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) in accordance with the instructions provided by the manufacturer. Additionally, the amino acid sequence of human SEP, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with a sequence from other subunits, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

25 In another embodiment of the invention, a human SEP natural, modified or recombinant sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of peptide libraries for inhibitors of SEP activity, it may be useful to encode a chimeric SEP protein expressing a heterologous epitope that is recognised by a commercially available antibody. A fusion protein may also be engineered to contain a cleavage site located between a SEP sequence and the heterologous protein sequence, so that the SEP may be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Human SEP may also be expressed as a recombinant protein with one or more additional polypeptide domains added to facilitate protein purification. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilised metals (Porath J, Protein Expr. Purif., Vol 3, 1992, pp. 263-281), protein A domains that allow purification on immobilised immunoglobulin, and the domain utilised in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp, Seattle, WA, USA). The inclusion of a cleavable linker sequence such as Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA, USA) between the purification domain and SEP is useful to facilitate purification.

A specific amino acid sequence of human SEP is shown in SEQ ID NO: 2. However, the present invention encompasses amino acid sequences encoding other members from the SEP family which would include amino acid sequences having at least 78% identity (more preferably at least 85% identity) to that specific amino acid sequence.

Polypeptides of the present invention also include fragments of the present amino acid sequence and variants thereof. Suitable fragments will be at least 5, e.g. at least 10, 12, 15 or 20 amino acids in size.

Polypeptides of the present invention may also be modified to contain one or more (e.g. at least 2, 3, 5 or 10) substitutions, deletions or insertions, including conserved substitutions. These aspects are discussed in a later section.

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE PRESENT INVENTION

The term "nucleotide sequence" as used herein refers to an oligonucleotide sequence or polynucleotide sequence, and variants, homologues, fragments and derivatives thereof (such as portions thereof). The nucleotide sequence may be DNA or RNA which may be of genomic or synthetic or recombinant origin which may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Preferably, the term "nucleotide sequence" means DNA.

More preferably, the term "nucleotide sequence" means DNA prepared by use of recombinant DNA techniques (i.e. recombinant DNA).

5

In a preferred embodiment, the nucleotide sequence *per se* of the present invention does not cover the native nucleotide coding sequence according to the present invention in its natural environment when it is under the control of its native promoter which is also in its natural environment. For ease of reference, we have called this preferred embodiment the "non-native nucleotide sequence".

10

The nucleotide sequences of the present invention may include within them synthetic or modified nucleotides. A number of different types of modification to oligonucleotides are known in the art. These include methylphosphonate and phosphorothioate backbones, addition of acridine or polylysine chains at the 3' and/or 5' ends of the molecule. For the purposes of the present invention, it is to be understood that the nucleotide sequences described herein may be modified by any method available in the art. Such modifications may be carried out in to enhance the *in vivo* activity or life span of nucleotide sequences of the present invention.

20

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are complementary to the sequences presented herein, or any derivative, fragment or variant thereof. If the sequence is complementary to a fragment thereof then that sequence can be used a probe to identify similar coding sequences in other organisms, etc.

25

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridising to the sequences presented herein, or any derivative, fragment or variant thereof.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridising to the sequences that are complementary to the sequences presented herein, or any derivative, fragment or variant thereof.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The term "variant" also encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising to the nucleotide sequences presented herein.

Preferably, the term "variant" encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₃ citrate pH 7.0}) to the nucleotide sequences presented herein.

The present invention also relates to nucleotide sequences that can hybridise to the nucleotide sequences of the present invention (including complementary sequences of those presented herein).

The present invention also relates to nucleotide sequences that are complementary to sequences that can hybridise to the nucleotide sequences of the present invention (including complementary sequences of those presented herein).

Also included within the scope of the present invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridising to the nucleotide sequences presented herein under conditions of intermediate to maximal stringency.

In a preferred aspect, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridise to the nucleotide sequence of the present invention, or the complement thereof, under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC).

Exemplary nucleic acids can alternatively be characterised as those nucleotide sequences which encode a human SEP protein and hybridise to the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. Preferred are such sequences encoding human SEP which hybridise under high-stringency conditions to the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or the complement thereof.

Advantageously, the invention provides nucleic acid sequences which are capable of hybridising, under stringent conditions, to a fragment of the sequence shown in the SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or the complement thereof. Preferably, the fragment is

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

between 15 and 50 bases in length. Advantageously, it is about 25 bases in length.

The terms "variant", "homologue", "derivative" or "fragment" in relation to the nucleotide sequence coding for the preferred enzyme of the present invention include any substitution
 5 of variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) nucleic acid from or to the sequence providing the resultant nucleotide sequence codes for or is capable of coding for an enzyme having SEP activity, preferably being at least as biologically active as the enzyme encoded by the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. In particular, the term "homologue" covers homology with respect to structure
 10 and/or function providing the resultant nucleotide sequence codes for or is capable of coding for an enzyme having SEP activity. With respect to sequence homology, preferably there is at least 83%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90% homology to a nucleotide sequence coding for the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. More preferably there is at least 95%, more preferably at least 98% homology to a
 15 nucleotide sequence coding for the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2. With respect to sequence homology, preferably there is at least 83%, more preferably at least 87%, more preferably at least 90% homology to the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. More preferably there is at least 95%, more preferably at least 98%, homology to the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5.

20

As indicated, the present invention relates to a DNA sequence (preferably a cDNA sequence) encoding human SEP. In particular, the present invention relates to cDNA sequences encoding human SEP.

25

The present invention also relates to DNA segments comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or allelic variations thereof.

The present invention also relates to polypeptides produced by expression in a host cell into which has been incorporated the foregoing DNA sequences or allelic variations thereof.

30

The present invention also provides DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or allelic variations thereof.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The present invention also relates to non-native DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or allelic variations thereof.

- 5 A highly preferred aspect of the present invention relates to recombinant DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or allelic variations thereof.

- Polynucleotides of the present invention include nucleic acid sequences encoding the polypeptides of the present invention. It will be appreciated that a range of different
10 polynucleotides encode a given amino acid sequence as a consequence of the degeneracy of the genetic code.

- By knowledge of the amino acid sequences set out herein it is possible to devise partial and full-length nucleic acid sequences such as cDNA and/or genomic clones that encode
15 the polypeptides of the present invention. For example, polynucleotides of the present invention may be obtained using degenerate polymerase chain reaction (PCR) which will use primers designed to target sequences encoding the amino acid sequences presented herein. The primers will typically contain multiple degenerate positions. However, to minimise degeneracy, sequences will be chosen that encode regions of the amino acid
20 sequences presented herein containing amino acids such as methionine which are coded for by only one triplet. In addition, sequences will be chosen to take into account codon usage in the organism whose nucleic acid is used as the template DNA for the PCR procedure. PCR will be used at stringency conditions lower than those used for cloning sequences with single sequence (non-degenerate) primers against known sequences.

- 25 Nucleic acid sequences obtained by PCR that encode polypeptide fragments of the present invention may then be used to obtain larger sequences using hybridisation library screening techniques. For example a PCR clone may be labelled with radioactive atoms and used to screen a cDNA or genomic library from other species, preferably other
30 mammalian species. Hybridisation conditions will typically be conditions of medium to high stringency (for example 0.03M sodium chloride and 0.03M sodium citrate at from about 50°C to about 60°C).

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Degenerate nucleic acid probes encoding all or part of the amino acid sequence may also be used to probe cDNA and/or genomic libraries from other species, preferably other mammalian species. However, it is preferred to carry out PCR techniques initially to
5 obtain a single sequence for use in further screening procedures.

In accordance with the present invention, polynucleotide sequences which encode human SEP, fragments of the polypeptide, fusion proteins or functional equivalents thereof, may be used to generate recombinant DNA molecules that direct the expression of human SEP
10 in appropriate host cells. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence, may be used to clone and express human SEP. As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce human SEP-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. Codons preferred by a particular
15 prokaryotic or eukaryotic host (Murray E *et al.*, (1989), *Nuc. Acids Res.*, 17:477-508) can be selected, for example, to increase the rate of human SEP expression or to produce recombinant RNA transcripts having desirable properties, such as a longer half-life, than transcripts produced from naturally occurring sequence.

Polynucleotide sequences of the present invention obtained using the techniques described above may be used to obtain further homologous sequences and variants using the techniques described above. They may also be modified for use in expressing the polypeptides of the present invention in a variety of host cells systems, for example to optimise codon preferences for a particular host cell in which the polynucleotide
25 sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the property or function of the polypeptides encoded by the polynucleotides.

Altered human SEP polynucleotide sequences which may be used in accordance with the invention include deletions, insertions or substitutions of different nucleotide residues
30 resulting in a polynucleotide that encodes the same or a functionally equivalent SEP. The protein may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

produce a silent change and result in a functionally equivalent SEP. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the biological activity of SEP is retained. For example, negatively charged amino acids
 5 include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

10 Included within the scope of the present invention are alleles of human SEP. As used herein, an "allele" or "allelic sequence" is an alternative form of human SEP. Alleles result from a mutation, i.e. a change in the nucleic acid sequence, and generally produce altered mRNAs or polypeptides whose structure or function may or may not be altered. Any given gene may have none, one or many allelic forms. Common mutational changes
 15 which give rise to alleles are generally ascribed to deletions, additions or substitutions of amino acids. Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, one or more times in a given sequence.

The nucleotide sequences of the present invention may be engineered in order to alter a
 20 human SEP coding sequence for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing and/or expression of the gene product. For example, mutations may be introduced using techniques which are well known in the art, e.g. site-directed mutagenesis to insert new restriction sites, to alter glycosylation patterns or to change codon preference.

25 Polynucleotides of the present invention may be used to produce a primer, e.g. a PCR primer, a primer for an alternative amplification reaction, a probe e.g. labelled with a revealing label by conventional means using radioactive or non-radioactive labels, or the polynucleotides may be cloned into vectors. Such primers, probes and other fragments
 30 will be at least 15, preferably at least 20, for example at least 25, 30 or 40 nucleotides in length, and are also encompassed by the term polynucleotides of the present invention as used herein.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Polynucleotides or primers of the present invention may carry a revealing label. Suitable labels include radioisotopes such as ^{32}P or ^{35}S , enzyme labels, or other protein labels such as biotin. Such labels may be added to polynucleotides or primers of the present invention and may be detected using by techniques known in the art.

Polynucleotides such as a DNA polynucleotide and primers according to the present invention may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step wise manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

Longer polynucleotides will generally be produced using recombinant means, for example using PCR cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15-30 nucleotides) to a region of the nucleotide sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from, e.g., a fungal, plant or prokaryotic cell, performing a polymerase chain reaction under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

DNA molecules may be modified to increase intracellular stability and half-life. Possible modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences of the 5' and/or 3' ends of the molecule or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the backbone of the molecule.

As mentioned earlier, the present invention also relates to nucleotide sequences that are capable of hybridising to all or part of the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or an allelic variation thereof. These nucleotide sequences may be used in antisense

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

techniques to modify human SEP expression. Alternatively, these sequences (or portions thereof) can be used as a probe, or for amplifying all or part of such sequence when used as a PCR primer.

- 5 In addition to the recombinant DNA sequences, genomic sequences are also of utility in the context of drug discovery. It may be valuable to inhibit the mRNA transcription of a particular isoform rather than to inhibit its translated protein. This may be true with human SEP, if there are splice variants and wherein those different splice variants may be transcribed from different promoters.

- 10 Another utility of the invention is that the DNA sequences, once known, give the information needed to design assays to specifically detect isoenzymes or splice variants. Isoenzyme-specific PCR primer pairs are but one example of an assay that depends completely on the knowledge of the specific DNA sequence of the isoenzyme or splice
15 variant. Such an assay allows detection of mRNA for the isoenzyme to access the tissue distribution and biological relevance of each isoenzyme to a particular disease state. It also allows identification of cell lines that may naturally express only one isoenzyme - a discovery that might obviate the need to express recombinant genes. If specific human SEP isoenzymes are shown to be associated with a particular disease state, the invention would
20 be valuable in the design of diagnostic assays to detect the presence of isoenzyme mRNA.

- An abnormal level of nucleotide sequences encoding a human SEP enzyme in a biological sample may reflect a chromosomal aberration, such as a nucleic acid deletion or mutation. Accordingly, nucleotide sequences encoding a human SEP enzyme provide
25 the basis for probes which can be used diagnostically to detect chromosomal aberrations such as deletions, mutations or chromosomal translocations in the gene encoding human SEP. Human SEP gene expression may be altered in such disease states or there may be a chromosomal aberration present in the region of the gene encoding a human SEP.

- 30 In an alternative embodiment of the invention, the coding sequence of human SEP could be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers MH *et al.*, (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser., pp. 215-223; Horn T *et al.*,

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

(1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser., pp. 225-232).

NATURALLY OCCURRING

- 5 As used herein "naturally occurring" refers to a human SEP with an amino acid sequence found in nature.

ISOLATED/PURIFIED

- 10 As used herein, the terms "isolated" and "purified" refer to molecules, either nucleic or amino acid sequences, that are removed from their natural environment and isolated or separated from at least one other component with which they are naturally associated.

BIOLOGICALLY ACTIVE

- 15 As used herein "biologically active" refers to a human SEP according to the present invention - such as a recombinant human SEP - having a similar structural function (but not necessarily to the same degree), and/or similar regulatory function (but not necessarily to the same degree), and/or similar biochemical function (but not necessarily to the same degree) and/or immunological activity (but not necessarily to the same degree) of the naturally occurring human SEP. Specifically, a human SEP of the present invention has the ability to proteolytically cleave certain peptide substrates, which is one of the characteristic activities of the human SEP enzyme of the present invention.
- 20

25 IMMUNOLOGICAL ACTIVITY

As used herein, "immunological activity" is defined as the capability of the natural, recombinant or synthetic human SEP or any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

DERIVATIVE

The term "derivative" as used herein in relation to the amino acid sequence includes chemical modification of a human SEP. Illustrative of such modifications would be
5 replacement of hydrogen by an alkyl, acyl, or amino group.

DELETION

As used herein a "deletion" is defined as a change in either nucleotide or amino acid
10 sequence in which one or more nucleotides or amino acid residues, respectively, are absent.

INSERTION/ADDITION

15 As used herein an "insertion" or "addition" is a change in a nucleotide or amino acid sequence which has resulted in the addition of one or more nucleotides or amino acid residues, respectively, as compared to the naturally occurring human SEP.

SUBSTITUTION

20 As used herein "substitution" results from the replacement of one or more nucleotides or amino acids by different nucleotides or amino acids, respectively.

HOMOLOGUE

25 The term "homologue" with respect to the nucleotide sequence of the present invention and the amino acid sequence of the present invention may be synonymous with allelic variations of the sequences.

30 In particular, the term "homology" as used herein may be equated with the term "identity". Here, sequence homology with respect to the nucleotide sequence of the present invention and the amino acid sequence of the present invention can be determined by a simple

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

"eyeball" comparison (i.e. a strict comparison) of any one or more of the sequences with another sequence to see if that other sequence has at least 83% identity to the nucleotide sequence and at least 78% identity to the amino acid sequences. Relative sequence homology (i.e. sequence identity) can also be determined by commercially available
5 computer programs that can calculate percentage (%) homology between two or more sequences. Typical examples of such computer programs are CLUSTAL or BLAST.

Percentage (%) homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence directly compared
10 with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues (for example less than 50 contiguous amino acids).

15 Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into
20 consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the
25 alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system.
30 High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Examples of other software that can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* - Chapter 18), FASTA (Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for off-line and on-line searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However, for some applications it is preferred to use the GCG Bestfit program.

Although the final % homology can be measured in terms of identity, in some cases, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied (see user manual for further details). It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

As indicated, for some applications, sequence homology (or identity) may be determined using any suitable homology algorithm, using for example default parameters. For a discussion of basic issues in similarity searching of sequence databases, see Altschul *et al.* (1994) Nature Genetics 6:119-129. For some applications, the BLAST algorithm is

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

employed, with parameters set to default values. The BLAST algorithm is described in detail at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html. Advantageously, "substantial homology" when assessed by BLAST equates to sequences which match with an EXPECT value of at least about e^{-7} , preferably at least about e^{-9} and most preferably e^{-10} or lower. The default threshold for EXPECT in BLAST searching is usually 10.

Should Gap Penalties be used when determining sequence identity, then preferably the following parameters are used:

FOR BLAST	
GAP OPEN	5
GAP EXTENSION	2

10

FOR CLUSTAL	DNA	PROTEIN	
WORD SIZE	2	1	K triple
GAP PENALTY	10	10	
GAP EXTENSION	0.1	0.1	

Other computer program methods to determine identity and similarity between the two sequences include but are not limited to the GCG program package (Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research, 12: 387) and FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Molec. Biol., pp. 403-410).

POLYPEPTIDE VARIANTS AND DERIVATIVES

The terms "variant" or "derivative" in relation to the amino acid sequences of the present invention includes any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) amino acids from or to the sequence providing the resultant amino acid sequence has human SEP activity, preferably having at least the same activity as the polypeptide presented in SEQ ID NO: 2.

25

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The sequences of the present invention may be modified for use in the present invention. Typically, modifications are made that maintain the human SEP activity of the sequence. Amino acid substitutions may be made, for example from 1, 2 or 3 to 10, 20 or 30 substitutions provided that the modified sequence retains the human SEP activity. Amino acid substitutions may include the use of non-naturally occurring analogues, for example to increase blood plasma half-life of a therapeutically administered polypeptide.

Conservative substitutions may be made, for example, according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

ALIPHATIC	Non-polar	G A P I L V
	Polar - uncharged	C S T M N Q
	Polar - charged	D E K R
		H F W Y
AROMATIC		

As indicated above, proteins of the invention are typically made by recombinant means, for example as described herein, and/or by using synthetic means using techniques well known to the skilled person such as solid phase synthesis. Variants and derivatives of such sequences include fusion proteins, wherein the fusion proteins comprise at least the amino acid sequence of the present invention being linked (directly or indirectly) to another amino acid sequence. These other amino acid sequences - which are sometimes referred to as fusion protein partners - will typically impart a favourable functionality - such as to aid extraction and purification of the amino acid sequence of the present invention. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β -galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence of the present invention so as to allow removal of the latter. Preferably the fusion protein partner will not hinder the function of the protein of the present invention.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

POLYNUCLEOTIDE VARIANTS AND DERIVATIVES

The terms "variant" or "derivative" in relation to the nucleotide sequence of the present invention include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion
5 of or addition of one (or more) nucleic acid from or to the sequence providing the resultant nucleotide sequence codes for a polypeptide having human SEP activity, preferably having at least the same activity as the polypeptide encoded by the sequence presented in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5.

10 As indicated above, with respect to sequence homology, preferably there is at least 83%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90% homology to the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. More preferably there is at least 95%, more preferably at least 98%, homology. Nucleotide homology comparisons may be conducted as described above. For some applications, a preferred sequence comparison program is the
15 GCG Wisconsin Bestfit program described above. The default scoring matrix has a match value of 10 for each identical nucleotide and -9 for each mismatch. The default gap creation penalty is -50 and the default gap extension penalty is -3 for each nucleotide.

As used herein, the terms "variant", "homologue", "fragment" and "derivative" embrace
20 allelic variations of the sequences.

The term "variant" also encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising to the nucleotide sequences presented herein.

25 HYBRIDISATION

The term "hybridisation" as used herein shall include "the process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing" (Coombs J (1994) Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York NY) as well as the process of
30 amplification as carried out in PCR technologies as described in Dieffenbach CW and Dveksler (1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, USA).

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Hybridisation conditions are based on the melting temperature (T_m) of the nucleic acid binding complex, as taught in Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA, USA), and confer a defined "stringency" as explained below.

Stringency of hybridisation refers to conditions under which polynucleic acids hybrids are stable. Such conditions are evident to those of ordinary skill in the field. As known to those of skill in the art, the stability of hybrids is reflected in the melting temperature (T_m) of the hybrid which decreases approximately 1 to 1.5°C with every 1% decrease in sequence homology. In general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion concentration and temperature. Typically, the hybridisation reaction is performed under conditions of higher stringency, followed by washes of varying stringency.

As used herein, high stringency refers to conditions that permit hybridisation of only those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 1 M Na^+ at 65-68°C.

Maximum stringency typically occurs at about $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C below the T_m of the probe).

High stringency occurs at about 5°C to 10°C below the T_m of the probe. High stringency conditions can be provided, for example, by hybridisation in an aqueous solution containing 6xSSC, 5xDenhardt's, 1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1 Na^+ pyrophosphate and 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA as non specific competitor. Following hybridisation, high stringency washing may be done in several steps, with a final wash (about 30 min) at the hybridisation temperature in 0.2 -0.1xSSC, 0.1% SDS.

Moderate, or intermediate, stringency typically occurs at about 10°C to 20°C below the T_m of the probe.

Low stringency typically occurs at about 20°C to 25°C below the T_m of the probe.

As will be understood by those of skill in the art, a maximum stringency hybridisation

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

can be used to identify or detect identical polynucleotide sequences while an intermediate (or low) stringency hybridisation can be used to identify or detect similar or related polynucleotide sequences.

5 Moderate stringency refers to conditions equivalent to hybridisation in the above-described solution but at about 60-62°C. In that case the final wash is performed at the hybridisation temperature in 1xSSC, 0.1% SDS.

Low stringency refers to conditions equivalent to hybridisation in the above-described
10 solution at about 50-52°C. In that case, the final wash is performed at the hybridisation temperature in 2xSSC, 0.1% SDS.

It is understood that these conditions may be adapted and duplicated using a variety of buffers, e.g. formamide-based buffers, and temperatures. Denhardt's solution and SSC are
15 well known to those of skill in the art as are other suitable hybridisation buffers (see, e.g., Sambrook, *et al.*, eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; or Ausubel, *et al.*, eds. (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.). Optimal hybridisation conditions have to be determined empirically, as the length and the GC content of the probe also play a role.

20 Polynucleotides of the invention capable of selectively hybridising to the nucleotide sequences presented herein, or to their complement, will be generally at least 83%, preferably at least 85% or 90% and more preferably at least 95% or 98% homologous to the corresponding nucleotide sequences presented herein over a region of at least 20, preferably
25 at least 25 or 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides.

The term "selectively hybridisable" means that the polynucleotide used as a probe is used under conditions where a target polynucleotide of the invention is found to hybridize to the probe at a level significantly above background. The background hybridization may occur
30 because of other polynucleotides present, for example, in the cDNA or genomic DNA library being screened. In this event, background implies a level of signal generated by interaction between the probe and a non-specific DNA member of the library which is less

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

than 10-fold, preferably less than 100-fold as intense as the specific interaction observed with the target DNA. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with ^{32}P .

- 5 In a preferred aspect, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridise to any one or more of the nucleotide sequences of the present invention under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₂ Citrate pH 7.0}).

- 10 Where the polynucleotide of the present invention is double-stranded, both strands of the duplex, either individually or in combination, are encompassed by the present invention. Where the polynucleotide is single-stranded, it is to be understood that the complementary sequence of that polynucleotide is also included within the scope of the present invention.

- Polynucleotides which are not 100% homologous to the sequences of the present invention but fall within the scope of the invention can be obtained in a number of ways. Other variants of the sequences described herein may be obtained, for example, by probing DNA libraries made from a range of individuals, for example individuals from different populations. In addition, other viral/bacterial, or cellular homologues particularly cellular homologues found in mammalian cells (e.g. bovine, ovine, porcine, equine and primate cells), may be obtained and such homologues and fragments thereof in general will be capable of selectively hybridising to the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. Such sequences may be obtained by probing cDNA libraries made from, or genomic DNA libraries derived from, other animal species, and probing such libraries with probes comprising all or part of the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 under conditions of medium to high stringency. Similar considerations apply to obtaining species homologues and allelic variants of the polypeptide or nucleotide sequences of the invention.
- 25

- 30 Variants and strain/species homologues may also be obtained using degenerate PCR which will use primers designed to target sequences within the variants and homologues encoding conserved amino acid sequences within the sequences of the present invention. Conserved sequences can be predicted, for example, by aligning the amino acid sequences from several variants/homologues. Sequence alignments can be performed using computer software

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

known in the art. For example the GCG Wisconsin PileUp program is widely used.

The primers used in degenerate PCR will contain one or more degenerate positions and will be used at stringency conditions lower than those used for cloning sequences with single
5 sequence primers against known sequences.

Alternatively, such polynucleotides may be obtained by site-directed mutagenesis of characterised sequences. This may be useful where, for example, silent codon changes are required to sequences to optimise codon preferences for a particular host cell in which the
10 polynucleotide sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the property or function of the polypeptides encoded by the polynucleotides.

Polynucleotides of the invention may be used to produce a primer, e.g. a PCR primer, a
15 primer for an alternative amplification reaction, a probe e.g. labelled with a revealing label by conventional means using radioactive or non-radioactive labels, or the polynucleotides may be cloned into vectors. Such primers, probes and other fragments will be at least 15, preferably at least 20, for example at least 25, 30 or 40 nucleotides in length, and are also encompassed by the term polynucleotides of the invention as used herein.

20

Polynucleotides such as a DNA polynucleotides and probes according to the invention may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

25 In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step wise manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Longer polynucleotides will generally be produced using recombinant means, for example using a PCR cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15 to 30 nucleotides) flanking a region of the sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from an animal or human cell, performing a polymerase chain reaction under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

10

REGULATORY SEQUENCES

Preferably, the polynucleotide of the present invention is operably linked to a regulatory sequence which is capable of providing for the expression of the coding sequence, such as by the chosen host cell. By way of example, the present invention covers a vector comprising the polynucleotide of the present invention operably linked to such a regulatory sequence, i.e. the vector is an expression vector.

The term "operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A regulatory sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under condition compatible with the control sequences.

The term "regulatory sequences" includes promoters and enhancers and other expression regulation signals.

The term "promoter" is used in the normal sense of the art, e.g. an RNA polymerase binding site.

30

Enhanced expression of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention may also be achieved by the selection of heterologous regulatory regions, e.g.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

promoter, secretion leader and terminator regions, which serve to increase expression and, if desired, secretion levels of the protein of interest from the chosen expression host and/or to provide for the inducible control of the expression of the polypeptide of the present invention.

5

Preferably, the nucleotide sequence of the present invention may be operably linked to at least a promoter.

Aside from the promoter native to the gene encoding the polypeptide of the present invention, other promoters may be used to direct expression of the polypeptide of the present invention. The promoter may be selected for its efficiency in directing the expression of the polypeptide of the present invention in the desired expression host.

In another embodiment, a constitutive promoter may be selected to direct the expression of the desired polypeptide of the present invention. Such an expression construct may provide additional advantages since it circumvents the need to culture the expression hosts on a medium containing an inducing substrate.

Examples of strong constitutive and/or inducible promoters which are preferred for use in fungal expression hosts are those which are obtainable from the fungal genes for xylanase (*xlnA*), phytase, ATP-synthetase, subunit 9 (*ohC*), triose phosphate isomerase (*tpi*), alcohol dehydrogenase (*AdhA*), α -amylase (*amy*), amyloglucosidase (AG - from the *glaA* gene), acetylaminidase (*amdS*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) promoters.

25

Examples of strong yeast promoters are those obtainable from the genes for alcohol dehydrogenase, lactase, 3-phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase.

Examples of strong bacterial promoters are the α -amylase and *SP02* promoters as well as promoters from extracellular protease genes.

Hybrid promoters may also be used to improve inducible regulation of the expression

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

construct.

The promoter can additionally include features to ensure or to increase expression in a suitable host. For example, the features can be conserved regions such as a Pribnow Box or a TATA box. The promoter may even contain other sequences to affect (such as to maintain, enhance, decrease) the levels of expression of the nucleotide sequence of the present invention. For example, suitable other sequences include the *Shl*-intron or an ADH intron. Other sequences include inducible elements - such as temperature, chemical, light or stress inducible elements. Also, suitable elements to enhance transcription or translation may be present. An example of the latter element is the TMV 5' signal sequence (see Sleat, Gene, 217, [1987], pp. 217-225; and Dawson, Plant Mol. Biol., 23, [1993], p. 97).

SECRETION

The human SEP of the present invention is naturally secreted from source cells, e.g. in the testis. However, it is possible that mutation of the polynucleotide sequence encoding human SEP or alterations in, or absence of, post-translational modifications within cells expressing human SEP could lead to non-extracellular secretion of human SEP (e.g. intracellular deposition). In such cases, it is desirable for the polypeptide of the present invention to be secreted from the expression host into the culture medium from where the polypeptide of the present invention may be more easily recovered. According to the present invention, a secretion leader sequence may be selected on the basis of the desired expression host. Hybrid signal sequences may also be used with the context of the present invention.

Typical examples of heterologous secretion leader sequences are those originating from the fungal amyloglucosidase (AG) gene (*glcA* - both 18 and 24 amino acid versions e.g. from *Aspergillus*), the α -factor gene (yeasts e.g. *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*) or the α -amylase gene (*Bacillus*).

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

CONSTRUCTS

The term "construct" - which is synonymous with terms such as "conjugate", "cassette" and "hybrid" - includes the nucleotide sequence according to the present invention directly or indirectly attached to a promoter. An example of an indirect attachment is the provision of a suitable spacer group such as an intron sequence, such as the *Sh1*-intron or the *ADH* intron, intermediate the promoter and the nucleotide sequence of the present invention. The same is true for the term "fused" in relation to the present invention which includes direct or indirect attachment. In each case, the terms do not cover the natural combination of the nucleotide sequence coding for the protein ordinarily associated with the wild type gene promoter and when they are both in their natural environment.

The construct may even contain or express a marker which allows for the selection of the genetic construct in, for example, a bacterium, preferably of the genus *Bacillus*, such as *Bacillus subtilis*, or plants into which it has been transferred. Various markers exist which may be used, such as, for example, those encoding mannose-6-phosphate isomerase (especially for plants) or those markers that provide for antibiotic resistance - e.g. resistance to G418, hygromycin, bleomycin, kanamycin and gentamycin.

Preferably the construct of the present invention comprises at least the nucleotide sequence of the present invention operably linked to a promoter.

VECTORS

The term "vector" includes expression vectors and transformation vectors and shuttle vectors.

The term "expression vector" means a construct capable of *in vivo* or *in vitro* expression.

The term "transformation vector" means a construct capable of being transferred from one entity to another entity - which may be of the same species or may be of a different species. If the construct is capable of being transferred from one species to another - such as from an

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

E. coli plasmid to a bacterium, such as of the genus *Bacillus*, then the transformation vector is sometimes called a "shuttle vector". It may even be a construct capable of being transferred from an *E. coli* plasmid to an *Agrobacterium* to a plant.

- 5 The vectors of the present invention may be transformed into a suitable host cell as described below to provide for expression of a polypeptide of the present invention. Thus, in a further aspect the invention provides a process for preparing polypeptides according to the present invention which comprises cultivating a host cell transformed or transfected with an expression vector as described above under conditions to provide for
10 expression by the vector of a coding sequence encoding the polypeptides, and recovering the expressed polypeptides.

The vectors may be, for example, plasmid, virus or bacteriophage (phage) vectors provided with an origin of replication, optionally a promoter for the expression of the
15 polynucleotide and optionally a regulator of the promoter.

- The vectors of the present invention may contain one or more selectable marker genes. The most suitable selection systems for industrial micro-organisms are those formed by the group of selection markers which do not require a mutation in the host organism.
20 Examples of fungal selection markers are the genes for acetamidase (*amdS*), ATP synthetase, subunit 9 (*oltC*), orotidine-5'-phosphate-decarboxylase (*pyrA*), phlecomycin and benomyl resistance (*benA*). Examples of non-fungal selection markers are the bacterial G418 resistance gene (this may also be used in yeast, but not in filamentous fungi), the ampicillin resistance gene (*E. coli*), the neomycin resistance gene (*Bacillus*)
25 and the *E. coli uidA* gene, coding for β -glucuronidase (GUS).

Vectors may be used *in vitro*, for example for the production of RNA or used to transfect or transform a host cell.

- 30 Thus, polynucleotides of the present invention can be incorporated into a recombinant vector (typically a replicable vector), for example a cloning or expression vector. The vector may be used to replicate the nucleic acid in a compatible host cell. Thus, in a

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

further embodiment, the invention provides a method of making polynucleotides of the present invention by introducing a polynucleotide of the present invention into a replicable vector, introducing the vector into a compatible host cell, and growing the host cell under conditions which bring about replication of the vector. The vector may be recovered from the host cell. Suitable host cells are described below in connection with expression vectors.

The present invention also relates to the use of genetically engineered host cells expressing a human SEP or variant, homologue, fragment or derivative thereof in screening methods for the identification of modulators (e.g. inhibitors) of human SEP. Such genetically engineered host cells could be used to screen peptide libraries or organic molecules capable of modulating human SEP activity. Inhibitors of human SEP, such as antibodies, peptides or small organic molecules will provide the basis for pharmaceutical compositions for the prophylaxis and/or treatment of diseases associated with, for example, human SEP. Such inhibitors can be administered alone or in combination with other therapeutics for the prophylaxis and/or treatment of such diseases.

The present invention also relates to expression vectors and host cells comprising polynucleotide sequences encoding human SEP or a variant, homologue, fragment or derivative thereof for the *in vivo* or *in vitro* production of human SEP protein or to screen for agents that can affect human SEP expression or activity.

TISSUE

The term "tissue" as used herein includes tissue *per se* and organ.

HOST CELLS

The term "host cell" - in relation to the present invention - includes any cell that could comprise the nucleotide sequence coding for the recombinant protein according to the present invention and/or products obtained therefrom, wherein a promoter can allow expression of the nucleotide sequence according to the present invention when present in

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

the host cell.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of said polynucleotide. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may, for example, be prokaryotic (for example, bacterial cells), or eukaryotic (i.e. mammalian, fungal, insect, protozoan, yeast or plant cells).

10 The gram-negative bacterium *E. coli* is widely used as a host for heterologous gene expression. However, large amounts of heterologous protein tend to accumulate inside the cell. Subsequent purification of the desired protein from the bulk of *E. coli* intracellular proteins can sometimes be difficult.

15 In contrast to *E. coli*, bacteria from the genus *Bacillus* are very suitable as heterologous hosts because of their capability to secrete proteins into the culture medium. Other bacteria suitable as hosts are those from the genera *Streptomyces* and *Pseudomonas*.

Introduction of polynucleotides into host cells can be effected by methods as described in Sambrook, *et al.*, eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. These methods include, but are not limited to, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran-mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transfection, microinjection, transduction, scrape loading, and ballistic introduction.

25 Examples of representative hosts include, bacterial cells (e.g. *E. coli*, *Streptomyces*); fungal cells such as yeast cells and *Aspergillus*; insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* SF9 cells; animal cells such as CHO, COS, HEK, HeLa, and 3T3 cells. The selection of the appropriate host is deemed to be within the scope of those skilled in the art.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly expressed or secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Escherichia* species or *Bacillus* species (such as those described in EP-A-0134048 and EP-A-0253455), *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *tubigenis*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The use of suitable host cells - such as mammalian, yeast, insect, plant and fungal host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lipidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

ORGANISM

The term "organism" in relation to the present invention includes any organism, except man, that could comprise the nucleotide sequence coding for the recombinant protein according to the present invention and/or products obtained therefrom, wherein a promoter can allow expression of the nucleotide sequence according to the present invention when present in the organism. Examples of organisms may include a fungus, yeast, plant or

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

protozoan.

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism, except man, that comprises the nucleotide sequence coding for the protein according to the present invention and/or products obtained therefrom, wherein the promoter can allow expression of the nucleotide sequence according to the present invention within the organism. Preferably the nucleotide sequence is incorporated in the genome of the organism.

10 The term "transgenic organism" does not cover the native nucleotide coding sequence according to the present invention in its natural environment when it is under the control of its native promoter which is also in its natural environment. In addition, the present invention does not cover the native protein according to the present invention when it is in its natural environment and when it has been expressed by its native nucleotide coding sequence which is also in its natural environment and when that nucleotide sequence is under the control of its native promoter which is also in its natural environment.

Therefore, the transgenic organism of the present invention includes an organism comprising any one of, or combinations of, the nucleotide sequence coding for the amino acid sequence according to the present invention, constructs according to the present invention (including combinations thereof), vectors according to the present invention, plasmids according to the present invention, cells according to the present invention, and tissues according to the present invention or the products thereof. The transformed cell or organism could prepare acceptable quantities of the desired compound which would be easily retrievable from the cell or organism.

TRANSFORMATION OF HOST CELLS/HOST ORGANISMS

As indicated earlier, the host organism can be a prokaryotic or a eukaryotic organism. Examples of suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Teachings on the transformation of prokaryotic hosts are well documented in the art, for example see Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA) and Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.).

In one embodiment, the transformed host is a mammalian cell or, for example, an insect cell, wherein introduction of polynucleotides into said host cells can be effected by methods as described in, for example, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA). These methods include, but are not limited to, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran-mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transfection, microinjection, transduction, scrape loading, and ballistic introduction.

In another embodiment the transgenic organism can be a yeast. In this regard, yeast have also been widely used as a vehicle for heterologous gene expression. The species *Saccharomyces cerevisiae* has a long history of industrial use, including its use for heterologous gene expression. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* has been reviewed by Goodey *et al.* (1987, Yeast Biotechnology, D R Bony *et al.*, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) and by King *et al.* (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E F Walton and G T Yarrington, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

For several reasons *Saccharomyces cerevisiae* is well suited for heterologous gene expression. First, it is non-pathogenic to humans and it is incapable of producing certain endotoxins. Second, it has a long history of safe use following centuries of commercial exploitation for various purposes. This has led to wide public acceptability. Third, the extensive commercial use and research devoted to the organism has resulted in a wealth of knowledge about the genetics and physiology as well as large-scale fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*.

A review of the principles of heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* and secretion of gene products is given by E Hinchcliffe and E Kenny ("Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", 1993, Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Several types of yeast vectors are available, including integrative vectors, which require recombination with the host genome for their maintenance, and autonomously replicating plasmid vectors.

- 5 In order to prepare the transgenic *Saccharomyces*, expression constructs are prepared by inserting the nucleotide sequence of the present invention into a construct designed for expression in yeast. Several types of constructs used for heterologous expression have been developed. The constructs contain a promoter active in yeast fused to the nucleotide sequence of the present invention, usually a promoter of yeast origin, such as the GAL1
10 promoter, is used. Usually a signal sequence of yeast origin, such as the sequence encoding the SUC2 signal peptide, is used. A terminator active in yeast ends the expression system.

- For the transformation of yeast several transformation protocols have been developed. For example, a transgenic *Saccharomyces* according to the present invention can be prepared by
15 following the teachings of Hinnea *et al.* (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 75: 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275:104); and Ito, H *et al.* (1983, J. Bacteriology 153:163-168).

- The transformed yeast cells are selected using various selective markers. Among the
20 markers used for transformation are a number of auxotrophic markers such as LEU2, HIS4 and TRP1, and dominant antibiotic resistance markers such as aminoglycoside antibiotic markers, e.g. G418.

- Another host organism is a plant. The basic principle in the construction of genetically
25 modified plants is to insert genetic information in the plant genome so as to obtain a stable maintenance of the inserted genetic material.

- Several techniques exist for inserting the genetic information, the two main principles being direct introduction of the genetic information and introduction of the genetic information by
30 use of a vector system. A review of the general techniques may be found in articles by Potykyus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) and Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech, March/April 1994, 17-27). Further teachings on plant

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

transformation may be found in EP-A-0449375.

Thus, the present invention also provides a method of transforming a host cell with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or a derivative,
5 homologue, variant or fragment thereof.

Host cells transformed with a human SEP nucleotide coding sequence may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or may be contained
10 intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing human SEP coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of human SEP coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane (if the human SEP is not secreted in the absence of such signal sequences). Other recombinant
15 constructions may join human SEP coding sequence to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins (Kroll DJ *et al.* (1993) DNA Cell Biol., Vol 12, pp. 441-53; see also above discussion of vectors containing fusion proteins).

20 GENETICALLY ENGINEERED or GENETICALLY MODIFIED

A cell, preferably an animal cell, that is "genetically modified" is heterozygous or homozygous for a modification that is introduced into the cell, or into a progenitor cell, by genetic engineering. The standard methods of genetic engineering that are available
25 for introducing the modification include homologous recombination, viral vector gene trapping, irradiation, chemical mutagenesis, and the transgenic expression of a nucleotide sequence encoding antisense RNA alone or in combination with catalytic ribozymes. Preferred methods for genetic modification are homologous recombination and viral vector gene trapping which both modify an endogenous gene by inserting a foreign
30 nucleic acid sequence into the gene locus. A nucleic acid sequence that is foreign to the gene is an exogenous sequence that is non-naturally occurring in the gene. This insertion of foreign DNA can occur within any region of the human SEP gene, e.g., in an enhancer,

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

promoter, regulator region, non-coding region, coding region, intron, or exon. The most preferred method of genetic engineering is homologous recombination, in which the foreign nucleic acid sequence is inserted in a targeted manner either alone or in combination with a deletion of a portion of the endogenous gene sequence.

5

FUNCTIONALLY DISRUPTED

By a human SEP gene that is "functionally disrupted" is meant a human SEP gene that is genetically modified such that the cellular activity of the human SEP polypeptide encoded by the disrupted gene is decreased in cells that normally express the wild-type version of the human SEP gene. When the genetic modification effectively eliminates all wild-type copies of the human SEP gene in a cell (e.g., the genetically modified cell, preferably an animal cell, is homozygous for the human SEP gene disruption or the only wild-type copy of human SEP gene originally present is now disrupted), then the genetic modification results in a reduction in human SEP polypeptide activity as compared to an appropriate control cell that expresses the wild-type human SEP gene. This reduction in human SEP polypeptide activity results from either reduced human SEP gene expression (i.e., human SEP mRNA levels are effectively reduced and produce reduced levels of human SEP polypeptide) and/or because the disrupted human SEP gene encodes a mutated polypeptide with reduced function or stability as compared to a wild-type human SEP polypeptide. Preferably, the activity of human SEP polypeptide in the genetically modified cell is reduced to 50% or less of wild-type levels, more preferably, to 25% or less, and, even more preferably, to 10% or less of wild-type levels. Most preferably, the human SEP gene disruption results in a null mutation.

20

GENETICALLY MODIFIED ANIMAL CELL

By a "genetically modified animal cell" containing a functionally disrupted human SEP gene is meant an animal cell, including a human cell, created by genetic engineering to contain a functionally disrupted human SEP gene, as well as daughter cells that inherit the disrupted human SEP gene. These cells may be genetically modified in culture according to any standard method known in the art. As an alternative to genetically

25

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

modifying the cells in culture, non-human mammalian cells may also be isolated from a genetically modified, non-human mammal that contains a human SEP gene disruption. The animal cells of the invention may be obtained from primary cell or tissue preparations as well as culture-adapted, tumorigenic, or transformed cell lines. These cells and cell lines are derived, for example, from endothelial cells, epithelial cells, islets, neurons and other neural tissue-derived cells, mesothelial cells, osteocytes, lymphocytes, chondrocytes, hematopoietic cells, immune cells, cells of the major glands or organs (e.g., liver, lung, heart, stomach, pancreas, kidney, and skin), muscle cells (including cells from skeletal muscle, smooth muscle, and cardiac muscle), exocrine or endocrine cells, fibroblasts, and embryonic and other totipotent or pluripotent stem cells (e.g., embryonic stem (ES) cells, ES-like cells, and embryonic germline (EG) cells, and other stem cells, such as progenitor cells and tissue-derived stem cells). The preferred genetically modified cells are ES cells, more preferably, mouse or rat ES cells, and, most preferably, human ES cells.

A "homology region" used in a targeting vector for homologous recombination with a human SEP gene is related (i.e., complementary) to a portion of the human SEP gene or a sequence flanking the human SEP gene to a degree sufficient to allow hybridization to occur between the homology region and the human SEP gene sequence under standard low stringency conditions known in the art (e.g., as described in Current Protocols in Human Genetics, unit 4.1, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000).

By an "ES cell" or an "ES-like cell" is meant a pluripotent stem cell derived from an embryo, from a primordial germ cell, or from a teratocarcinoma, that is capable of indefinite self renewal as well as differentiation into cell types that are representative of all three embryonic germ layers.

By "reduced" is meant a statistically significant decrease (i.e., $p < 0.1$).

The genetically modified animal cells, including human cells, of the invention are heterozygous or homozygous for a modification that functionally disrupts the human SEP gene. The animal cells may be derived by genetically engineering cells in culture, or, in

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

the case of non-human mammalian cells, the cells may be isolated from genetically modified, non-human mammals.

The human SEP gene locus is functionally disrupted by one of the several techniques for genetic modification known in the art, including chemical mutagenesis (Rimchik, Trends in Genetics 7: 15-21, 1991; Russell, Environmental & Molecular Mutagenesis 23 (Suppl. 24) 23-29, 1994), irradiation (Russell, *supra*), transgenic expression of human SEP gene antisense RNA, either alone or in combination with a catalytic RNA ribozyme sequence (Luyckx et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 12174-79, 1999; Sokol et al., Transgenic Research 5: 363-71, 1996; Efrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2051-55, 1994; Larson et al., Nucleic Acids Research 22: 2242-48, 1994) and, as further discussed below, the disruption of the human SEP gene by the insertion of a foreign nucleic acid sequence into the human SEP gene locus. Preferably, the foreign sequence is inserted by homologous recombination or by the insertion of a viral vector. Most preferably, the method of human SEP gene disruption is homologous recombination and includes a deletion of a portion of the endogenous human SEP gene sequence.

The integration of the foreign sequence functionally disrupts the human SEP gene through one or more of the following mechanisms: by interfering with the human SEP gene transcription or translation process (e.g., by interfering with promoter recognition, or by introducing a transcription termination site or a translational stop codon into the human SEP gene); or by distorting the human SEP gene coding sequence such that it no longer encodes a human SEP polypeptide with normal enzyme function (e.g., by inserting a foreign coding sequence into the human SEP gene coding sequence, by introducing a frameshift mutation or amino acid(s) substitution, or, in the case of a double crossover event, by deleting a portion of the human SEP gene coding sequence that is required for expression of a functional enzyme).

To insert a foreign sequence into a human SEP gene locus in the genome of a cell, the foreign DNA sequence is introduced into the cell according to a standard method known in the art such as electroporation, calcium-phosphate precipitation, retroviral infection, microinjection, biolistics, liposome transfection, DEAE-dextran transfection, or

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

transferrinfection (see, e.g., Neumann et al., EMBO J. 1: 841-845, 1982; Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 81: 7161-65, 1984; Chu et al., Nucleic Acids Res. 15: 1311-26, 1987; Thomas and Capecchi, Cell 51: 503-12, 1987; Baum et al., Biotechniques 17: 1058-62, 1994; Biowenga et al., J. Neuroscience Methods 71: 67-75, 1997; Zhang et al.,
 5 Biotechniques 15: 868-72, 1993; Ray and Gage, Biotechniques 13: 598-603, 1992; Lo, Mol. Cell. Biol. 3: 1803-14, 1983; Nickoloff et al., Mol. Biotech. 10: 93-101, 1998; Linney et al., Dev. Biol. (Orlando) 213: 207-16, 1999; Zimmer and Gruss, Nature 338: 150-153, 1989; and Robertson et al., Nature 323: 445-48, 1986). The preferred method for introducing foreign DNA into a cell is electroporation.

10

Homologous recombination

The method of homologous recombination targets the human SEP gene for disruption by introducing a human SEP gene targeting vector into a cell containing a human SEP gene.
 15 The ability of the vector to target the human SEP gene for disruption stems from using a nucleotide sequence in the vector that is homologous to the human SEP gene. This homology region facilitates hybridization between the vector and the endogenous sequence of the human SEP gene. Upon hybridization, the probability of a crossover event between the targeting vector and genomic sequences greatly increases. This
 20 crossover event results in the integration of the vector sequence into the human SEP gene locus and the functional disruption of the human SEP gene.

General principles regarding the construction of vectors used for targeting are reviewed in Bradley et al. (Biotechnol. 10: 534, 1992). Two different exemplary types of vector can
 25 be used to insert DNA by homologous recombination: an insertion vector or a replacement vector. An insertion vector is circular DNA which contains a region of human SEP gene homology with a double stranded break. Following hybridization between the homology region and the endogenous human SEP gene, a single crossover event at the double stranded break results in the insertion of the entire vector sequence
 30 into the endogenous gene at the site of crossover.

The more preferred vector to use for homologous recombination is a replacement vector,

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

which is colinear rather than circular. Replacement vector integration into the human SEP gene requires a double crossover event, i.e. crossing over at two sites of hybridization between the targeting vector and the human SEP gene. This double crossover event results in the integration of vector sequence that is sandwiched between the two sites of crossover into the human SEP gene and the deletion of the corresponding endogenous human SEP gene sequence that originally spanned between the two sites of crossover (see, e.g., Thomas and Capecchi et al., Cell 51: 503-12, 1987; Mansour et al., Nature 336: 348-52, 1988; Mansour et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7688-7692, 1990; and Mansour, GATA 7: 219-227, 1990).

A region of homology in a targeting vector is generally at least 100 nucleotides in length. Most preferably, the homology region is at least 1-5 kilobases (Kb) in length. Although there is no demonstrated minimum length or minimum degree of relatedness required for a homology region, targeting efficiency for homologous recombination generally corresponds with the length and the degree of relatedness between the targeting vector and the human SEP gene locus. In the case where a replacement vector is used, and a portion of the endogenous human SEP gene is deleted upon homologous recombination, an additional consideration is the size of the deleted portion of the endogenous human SEP gene. If this portion of the endogenous human SEP gene is greater than 1 Kb in length, then a targeting cassette with regions of homology that are longer than 1 Kb is recommended to enhance the efficiency of recombination. Further guidance regarding the selection and use of sequences effective for homologous recombination is described in the literature (see, e.g., Deng and Capecchi, Mol. Cell. Biol. 12: 3365-3371, 1992; Bollag et al., Annu. Rev. Genet. 23: 199-225, 1989; and Waldman and Liskay, Mol. Cell. Biol. 8: 5350-5357, 1988).

A wide variety of cloning vectors may be used as vector backbones in the construction of human SEP gene targeting vectors, including pBluescript-related plasmids (e.g., Bluescript KS+11), pQE70, pQE60, pQE-9, pBS, pD10, phagescript, phiX174, pBK Phagemid, pNH8A, pNH16a, pNH18Z, pNH46A, pIrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, and pRIT5 FWLNEO, pSV2CAT, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, PBVP, PMSG, and pSVL, pBR322 and pBR322-based vectors, pBM9, pBR325, pKH47,

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

pBR328, pHCT9, phage Charon 28, pKB11, pKSV-10, pK19 related plasmids, pUC plasmids, and the pGEM series of plasmids. These vectors are available from a variety of commercial sources (e.g., Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; Qiagen, Valencia, CA; Stratagene, La Jolla, CA; Promega, Madison, WI; and New England Biolabs, Beverly, MA; all in USA). However, any other vectors, e.g. plasmids, viruses, or parts thereof, may be used as long as they are replicable and viable in the desired host. The vector may also comprise sequences which enable it to replicate in the host whose genome is to be modified. The use of such a vector can expand the interaction period during which recombination can occur, increasing the efficiency of targeting (see 10 Molecular Biology, ed. Ausubel et al, Unit 9.16, Fig. 9.16.1).

The specific host employed for propagating the targeting vectors described above is not critical. Examples include *E. coli* K12 RR1 (Bolivar et al., Gene 2: 95, 1977), *E. coli* K12 HB101 (ATCC No. 33694), *E. coli* MM21 (ATCC No. 336780), *E. coli* DH1 15 (ATCC No. 33849), *E. coli* strain DH5 α , and *E. coli* STBL2. Alternatively, hosts such as *C. cerevisiae* can be used. The above-mentioned hosts are available commercially (e.g., Stratagene, La Jolla, CA, USA; and Life Technologies, Rockville, MD, USA).

To create the targeting vector, a human SEP gene targeting construct is added to an 20 above-described vector backbone. The human SEP gene targeting constructs described above have at least one human SEP gene homology region. To make the human SEP gene homology regions, a human SEP gene-related sequence is used as a basis for producing polymerase chain reaction (PCR) primers. These primers are used to amplify the desired region of the human SEP sequence by high fidelity PCR amplification 25 (Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19: 4967, 1991; Eckert and Kunkel I: 17, 1991; and U.S. Pat. No. 4,683,202). The genomic sequence is obtained from a genomic clone library or from a preparation of genomic DNA, preferably from the animal species that is to be targeted for human SEP gene disruption.

30 Preferably, the targeting constructs described above also include an exogenous nucleotide sequence encoding a positive marker protein. The stable expression of a positive marker after vector integration confers an identifiable characteristic on the cell without

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

compromising cell viability. Therefore, in the case of a replacement vector, the marker gene is positioned between two flanking homology regions so that it integrates into the human SEP gene following the double crossover event.

5 It is preferred that the positive marker protein is a selectable protein; the stable expression of such a protein in a cell confers a selectable phenotypic characteristic, i.e., the characteristic enhances the survival of the cell under otherwise lethal conditions. Thus, by imposing the selectable condition, one can isolate cells that stably express the positive selectable marker from other cells that have not successfully integrated the vector
 10 sequence on the basis of viability. Examples of positive selectable marker proteins (and their agents of selection) include Neo (G418 or kanomycin), Hyg (hygromycin), HisD (histidinol), Gpt (xanthine), Ble (bleomycin), and Hprt (hypoxanthine) (see, e.g., Capecchi and Thomas, U.S. Pat. No. 5,464,764, and Capecchi, Science 244: 1288-92, 1989). Other positive markers that may also be used as an alternative to a selectable
 15 marker include reporter proteins such as β -galactosidase, firefly luciferase, or green fluorescent protein (see, e.g., Current Protocols in Cytometry, Unit 9.5, and Current Protocols in Molecular Biology, Unit 9.6, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000).

The above-described positive selection scheme does not distinguish between cells that
 20 have integrated the vector by targeted homologous recombination at the human SEP gene locus versus random, non-homologous integration of vector sequence into any chromosomal position. Therefore, when using a replacement vector for homologous recombination, it is also preferred to include a nucleotide sequence encoding a negative selectable marker protein. Expression of a negative selectable marker causes a cell
 25 expressing the marker to lose viability when exposed to a certain agent (i.e., the marker protein becomes lethal to the cell under certain selectable conditions). Examples of negative selectable markers (and their agents of lethality) include herpes simplex virus thymidine kinase (gancyclovir or 1,2-deoxy-2-fluoro- α -D-arabinofuransyl-5-iodouracil), Hprt (6-thioguanine or 6-thioxanthine), and diphtheria toxin, ricin toxin, and cytosine
 30 deaminase (5-fluorocytosine).

The nucleotide sequence encoding the negative selectable marker is positioned outside of

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

the two homology regions of the replacement vector. Given this positioning, cells will only integrate and stably express the negative selectable marker if integration occurs by random, non-homologous recombination; homologous recombination between the human SEP gene and the two regions of homology in the targeting construct excludes the sequence encoding the negative selectable marker from integration. Thus, by imposing the negative condition, cells that have integrated the targeting vector by random, non-homologous recombination lose viability.

The above-described combination of positive and negative selectable markers is preferred because a series of positive and negative selection steps can be designed to more efficiently select only those cells that have undergone vector integration by homologous recombination, and, therefore, have a potentially disrupted human SEP gene. Further examples of positive-negative selection schemes, selectable markers, and targeting constructs are described, for example, in U.S. Pat. No. 5,464,764, WO 94/06908, and Valancius and Smithies, Mol. Cell. Biol. 11: 1402, 1991.

In order for a marker protein to be stably expressed upon vector integration, the targeting vector may be designed so that the marker coding sequence is operably linked to the endogenous human SEP gene promoter upon vector integration. Expression of the marker is then driven by the human SEP gene promoter in cells that normally express human SEP gene. Alternatively, each marker in the targeting construct of the vector may contain its own promoter that drives expression independent of the human SEP gene promoter. This latter scheme has the advantage of allowing for expression of markers in cells that do not typically express the human SEP gene (Smith and Berg, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49: 171, 1984; Sedivy and Sharp, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86: 227: 1989; Thomas and Capecchi, Cell 51: 503, 1987).

Exogenous promoters that can be used to drive marker gene expression include cell-specific or stage-specific promoters, constitutive promoters, and inducible or regulatable promoters. Non-limiting examples of these promoters include the herpes simplex thymidine kinase promoter, cytomegalovirus (CMV) promoter/enhancer, SV40 promoters, PGK promoter, PML-neo, metallothionein promoter, adenovirus late

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

promoter, vaccinia virus 7.5K promoter, avian beta globin promoter, histone promoters (e.g., mouse histone H3-614), beta actin promoter, neuron-specific enolase, muscle actin promoter, and the cauliflower mosaic virus 35S promoter (see, generally, Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, and *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 2000; Stratagene, La Jolla, CA, USA).

To confirm whether cells have integrated the vector sequence into the targeted human SEP gene locus, primers or genomic probes that are specific for the desired vector integration event can be used in combination with PCR or Southern blot analysis to identify the presence of the desired vector integration into the human SEP gene locus (Erich et al., *Science* 252: 1643-51, 1991; Zimmer and Gruss, *Nature* 338: 150, 1989; Mouellic et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 4712, 1990; and Shesely et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88: 4294, 1991).

15

Gene trapping

Another method available for inserting a foreign nucleic acid sequence into the human SEP gene locus to functionally disrupt the human SEP gene is gene trapping. This method takes advantage of the cellular machinery present in all mammalian cells that splices exons into mRNA to insert a gene trap vector coding sequence into a gene in a random fashion. Once inserted, the gene trap vector creates a mutation that may functionally disrupt the trapped human SEP gene. In contrast to homologous recombination, this system for mutagenesis creates largely random mutations. Thus, to obtain a genetically modified cell that contains a functionally disrupted human SEP gene, cells containing this particular mutation must be identified and selected from a pool of cells that contain random mutations in a variety of genes.

Gene trapping systems and vectors have been described for use in genetically modifying murine cells and other cell types (see, e.g., Allen et al., *Nature* 333: 852-55, 1988; Boilen et al., *Genes Dev.* 3: 1288-1300, 1989; Bier et al., *Genes Dev.* 3: 1273-1287, 1989; Bonnerot et al., *J. Virol.* 66: 4982-91, 1992; Brenner et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

5517-21, 1989; Chang et al., *Virology* 193: 737-47, 1993; Friedrich and Soriano, *Methods Enzymol.* 225: 681-701, 1993; Friedrich and Soriano, *Genes Dev.* 5: 1513-23, 1991; Goff, *Methods Enzymol.* 152: 469-81, 1987; Gossler et al., *Science* 244: 463-65, 1989; Hope, *Develop.* 113: 399-408, 1991; Kerr et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2: 767-776, 1989; Reddy et al., *J. Virol.* 65: 1507-1515, 1991; Reddy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6721-25, 1992; Skarnes et al., *Genes Dev.* 6: 903-918, 1992; von Melchner and Ruley, *J. Virol.* 63: 3227-3233, 1989; and Yoshida et al., *Transgen. Res.* 4: 277-87, 1995).

10 Promoter trap (5' trap) vectors contain, in 5' to 3' order, a splice acceptor sequence followed by an exon, which is typically characterized by a translation initiation codon and open reading frame (ORF) and/or an internal ribosome entry site. In general, these promoter trap vectors do not contain promoters or operably linked splice donor sequences. Consequently, after integration into the cellular genome of the host cell, the
15 promoter trap vector sequence intercepts the normal splicing of the upstream gene and acts as a terminal exon. Expression of the vector coding sequence is dependent upon the vector integrating into an intron of the disrupted gene in the proper reading frame. In such a case, the cellular splicing machinery splices exons from the trapped gene upstream of the vector coding sequence (Zambrowicz et al., WO 99/50426).

20 An alternative method for producing an effect similar to the above-described promoter trap vector is a vector that incorporates a nested set of stop codons present in, or otherwise engineered into, the region between the splice acceptor of the promoter trap vector and the translation initiation codon or polyadenylation sequence. The coding
25 sequence can also be engineered to contain an independent ribosome entry site (IRES) so that the coding sequence will be expressed in a manner largely independent of the site of integration within the host cell genome. Typically, but not necessarily, an IRES is used in conjunction with a nested set of stop codons.

30 Another type of gene trapping scheme uses a 3' gene trap vector. This type of vector contains, in operative combination, a promoter region, which mediates expression of an adjoining coding sequence, the coding sequence, and a splice donor sequence that defines

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

- the 3' end of the coding sequence exon. After integration into a host cell genome, the transcript expressed by the vector promoter is spliced to a splice acceptor sequence from the trapped gene that is located downstream of the integrated gene trap vector sequence. Thus, the integration of the vector results in the expression of a fusion transcript
- 5 comprising the coding sequence of the 3' gene trap cassette and any downstream cellular exons, including the terminal exon and its polyadenylation signal. When such vectors integrate into a gene, the cellular splicing machinery splices the vector coding sequence upstream of the 3' exons of the trapped gene. One advantage of such vectors is that the expression of the 3' gene trap vectors is driven by a promoter within the gene trap
- 10 cassette and does not require integration into a gene that is normally expressed in the host cell (Zambrowicz et al., WO 99/50426). Examples of transcriptional promoters and enhancers that may be incorporated into the 3' gene trap vector include those discussed above with respect to targeting vectors.
- 15 The viral vector backbone used as the structural component for the promoter or 3' gene trap vector may be selected from a wide range of vectors that can be inserted into the genome of a target cell. Suitable backbone vectors include, but are not limited to, herpes simplex virus vectors, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, pseudorabies virus, alpha-herpes virus vectors, and the like. A
- 20 thorough review of viral vectors, in particular, viral vectors suitable for modifying non-replicating cells and how to use such vectors in conjunction with the expression of an exogenous polynucleotide sequence, can be found in *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*, Eds. Caplitt and Loewy, Academic Press, San Diego, 1995.
- 25 Preferably, retroviral vectors are used for gene trapping. These vectors can be used in conjunction with retroviral packaging cell lines such as those described in U.S. Patent No. 5,449,614. Where non-murine mammalian cells are used as target cells for genetic modification, amphotropic or pantropic packaging cell lines can be used to package suitable vectors (Ory et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93: 11400-11406, 1996).
- 30 Representative retroviral vectors that can be adapted to create the presently described 3' gene trap vectors are described, for example, in U.S. Pat. No. 5,521,076.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The gene trapping vectors may contain one or more of the positive marker genes discussed above with respect to targeting vectors used for homologous recombination. Similar to their use in targeting vectors, these positive markers are used in gene trapping vectors to identify and select cells that have integrated the vector into the cell genome.

- 5 The marker gene may be engineered to contain an independent ribosome entry site (IRES) so that the marker will be expressed in a manner largely independent of the location in which the vector has integrated into the target cell genome.

- 10 Given that gene trap vectors will integrate into the genome of infected host cells in a fairly random manner, a genetically modified cell having a disrupted human SEP gene must be identified from a population of cells that have undergone random vector integration. Preferably, the genetic modifications in the population of cells are of sufficient randomness and frequency such that the population represents mutations in essentially every gene found in the cell's genome, making it likely that a cell with a
- 15 disrupted human SEP gene will be identified from the population (see Zambrowicz et al., WO 99/50426; Sands et al., WO 98/14614).

- Individual mutant cell lines containing a disrupted human SEP gene are identified in a population of mutated cells using, for example, reverse transcription and PCR (RT-PCR)
- 20 to identify a mutation in a human SEP gene sequence. This process can be streamlined by pooling clones. For example, to find an individual clone containing a disrupted human SEP gene, RT-PCR is performed using one primer anchored in the gene trap vector and the other primer located in the human SEP gene sequence. A positive RT-PCR result indicates that the vector sequence is encoded in the human SEP gene transcript, indicating
- 25 that human SEP gene has been disrupted by a gene trap integration event (see, e.g., Sands et al., WO 98/14614).

Temporal, spatial, and inducible gene disruptions

- 30 A functional disruption of the endogenous human SEP gene can occur at specific developmental or cell cycle stages (temporal disruption) or in specific cell types (spatial disruption). The human SEP gene disruption can also be inducible when certain

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

conditions are present. A recombinase excision system, such as a Cre-Lox system, may be used to activate or inactivate the human SEP gene at a specific developmental stage, in a particular tissue or cell type, or under particular environmental conditions. Generally, methods utilizing Cre-Lox technology are carried out as described by Torres and Kuhn, *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*, Oxford University Press, 1997. Methodology similar to that described for the Cre-Lox system can also be employed utilizing the FLP-FRT system. Further guidance regarding the use of recombinase excision systems for conditionally disrupting genes by homologous recombination or viral insertion is provided, for example, in U.S. Pat. No. 5,626,159, U.S. Pat. No. 5,527,695, U.S. Pat. No. 5,434,066, WO 98/29533, Orban et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 6861-65, 1992; O'Gorman et al., Science 251: 1351-55, 1991; Sauer et al., Nucleic Acids Research 17: 147-61, 1989; Barinaga, Science 265: 26-28, 1994; and Akagi et al., Nucleic Acids Res. 25: 1766-73, 1997. More than one recombinase system can be used to genetically modify an animal cell.

When using homologous recombination to disrupt the human SEP gene in a temporal, spatial, or inducible fashion, using a recombinase system such as the Cre-Lox system, a portion of the human SEP gene coding region is replaced by a targeting construct comprising the human SEP gene coding region flanked by loxP sites. Animal cells carrying this genetic modification contain a functional, loxP-flanked human SEP gene. The temporal, spatial, or inducible aspect of the human SEP gene disruption is caused by the expression pattern of an additional transgene, a Cre recombinase transgene, that is expressed in the animal cell under the control of the desired spatially-regulated, temporally-regulated, or inducible promoter, respectively. A Cre recombinase targets the loxP sites for recombination. Therefore, when Cre expression is activated, the loxP sites undergo recombination to excise the sandwiched human SEP gene coding sequence, resulting in a functional disruption of the human SEP gene (Rajewski et al., J. Clin. Invest. 98: 600-03, 1996; St-Onge et al., Nucleic Acids Res. 24: 3875-77, 1996; Agah et al., J. Clin. Invest. 100: 169-79, 1997; Brocard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14559-63, 1997; Feil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10887-90, 1996; and Kühn et al., Science 269: 1427-29, 1995).

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

A cell containing both a Cre recombinase transgene and loxP-flanked human SEP gene can be generated through standard transgenic techniques. Further guidance regarding the use of recombinase systems specific promoters to temporally, spatially, or conditionally disrupt the human SEP gene is found, for example, in Sauer, Meth. Enz. 225: 890-900, 5 1993, Gu et al., Science 265: 103-06, 1994, Araki et al., J. Biochem. 122: 977-82, 1997, Dymecki, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 6191-96, 1996, and Meyers et al., Nature Genetics 18: 136-41, 1998.

10 An inducible disruption of the human SEP gene can also be achieved by using a tetracycline responsive binary system (Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-51, 1992). This system involves genetically modifying a cell to introduce a Tet promoter into the endogenous human SEP gene regulatory element and a transgene expressing a tetracycline-controllable repressor (TetR). In such a cell, the administration of tetracycline activates the TetR which, in turn, inhibits human SEP gene expression 15 and, therefore, functionally disrupts the human SEP gene (St-Onge et al., Nucleic Acids Res. 24: 3875-77, 1996, U.S. Patent No. 5,922,927).

The above-described systems for temporal, spatial, and inducible disruptions of the human SEP gene can also be adopted when using gene trapping as the method of genetic 20 modification as described, for example, in WO 98/29533.

Creating genetically modified animal cells

The above-described methods for genetic modification can be used to functionally disrupt 25 a human SEP gene in virtually any type of somatic or stem cell derived from an animal. Genetically modified animal cells of the invention include, but are not limited to, mammalian cells, including human cells, and avian cells. These cells may be derived from genetically engineering any animal cell line, such as culture-adapted, tumorigenic, or transformed cell lines, or they may be isolated from a genetically modified, non-human 30 mammal carrying the desired human SEP genetic modification.

The cells may be heterozygous or homozygous for the disrupted human SEP gene. To

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

obtain cells that are homozygous for the human SEP gene disruption (human SEP^{-/-}), direct, sequential targeting of both alleles can be performed. This process can be facilitated by recycling a positive selectable marker. According to this scheme the nucleotide sequence encoding the positive selectable marker is removed following the

5 disruption of one allele using the Cre-Lox P system. Thus, the same vector can be used in a subsequent round of targeting to disrupt the second human SEP gene allele (Abuin and Bradley, Mol. Cell. Biol. 16: 1851-56, 1996; Sedivy et al., T.I.G. 15: 88-90, 1999; Cruz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7170-74, 1991; Mortensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7036-40, 1991; te Riele et al., Nature (London) 348: 649-651,

10 1990).

An alternative strategy for obtaining ES cells that are human SEP^{-/-} is the homogenotization of cells from a population of cells that is heterozygous for the human SEP gene disruption (human SEP^{+/-}). The method uses a scheme in which human

15 SEP^{+/-} targeted clones that express a selectable drug resistance marker are selected against a very high drug concentration; this selection favours cells that express two copies of the sequence encoding the drug resistance marker and are, therefore, homozygous for the human SEP gene disruption (Mortensen et al., Mol. Cell. Biol. 12: 2391-95, 1992).

20 Following the genetic modification of the desired cell or cell line, the human SEP gene locus can be confirmed as the site of modification by PCR analysis according to standard PCR or Southern blotting methods known in the art (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,683,202; and Erlich et al., Science 252: 1643, 1991). Further verification of the functional disruption of the human SEP gene may also be made if human SEP gene messenger RNA

25 (mRNA) levels and/or human SEP polypeptide levels are reduced in cells that normally express the human SEP gene. Measures of human SEP gene mRNA levels may be obtained by using reverse transcriptase mediated polymerase chain reaction (RT-PCR), Northern blot analysis, or *in situ* hybridization. The quantification of human SEP polypeptide levels produced by the cells can be made, for example, by standard

30 immunoassay methods known in the art. Such immunoassays include, but are not limited to, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as radioimmunoassays, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), "sandwich"

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

immunoassays, immunoradiometric assays, gel diffusion precipitation reactions, immunodiffusion assays, *in situ* immunoassays (using colloidal gold, enzymatic, or radioisotope labels, for example), Western blots, 2-dimensional gel analysis, precipitation reactions, immunofluorescence assays, protein A assays, and immunoelectrophoresis assays.

Preferred genetically modified animal cells are embryonic stem (ES) cells and ES-like cells. These cells are derived from the preimplantation embryos and blastocysts of various species, such as mice (Evans et al., Nature 129:154-156, 1981; Martin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78: 7634-7638, 1981), pigs and sheep (Notanianni et al., J. Reprod. Fert. Suppl., 43: 255-260, 1991; Campbell et al., Nature 380: 64-68, 1996) and primates, including humans (Thomson et al., U.S. Patent No. 5,843,780, Thomson et al., Science 282: 1145-1147, 1995; and Thomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844-7848, 1995).

These types of cells are pluripotent. That is, under proper conditions, they differentiate into a wide variety of cell types derived from all three embryonic germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm. Depending upon the culture conditions, a sample of ES cells can be cultured indefinitely as stem cells, allowed to differentiate into a wide variety of different cell types within a single sample, or directed to differentiate into a specific cell type, such as macrophage-like cells, neuronal cells, cardiomyocytes, adipocytes, smooth muscle cells, endothelial cells, skeletal muscle cells, keratinocytes, and hematopoietic cells, such as eosinophils, mast cells, erythroid progenitor cells, or megakaryocytes. Directed differentiation is accomplished by including specific growth factors or matrix components in the culture conditions, as further described, for example, in Keller et al., Curr. Opin. Cell Biol. 7: 862-69, 1995; Li et al., Curr. Biol. 8: 971, 1998; Klug et al., J. Clin. Invest. 98: 216-24, 1996; Lieschke et al., Exp. Hematol. 23: 328-34, 1995; Yamane et al., Blood 90: 3516-23, 1997, and Hirashima et al., Blood 93: 1253-63, 1999.

The particular embryonic stem cell line that is used for genetic modification is not critical; exemplary murine ES cell lines include AB-1 (McMahon and Bradley, Cell 62:1073-85, 1990), E14 (Hooper et al., Nature 326: 292-95, 1987), D3 (Doetschman et

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

al., *J. Embryol. Exp. Morph.* 87: 27-45, 1985), CCE (Robertson et al, *Nature* 323: 445-48, 1986), RW4 (Genome Systems, St. Louis, MO), and DBA/11acJ (Roach et al., *Exp. Cell Res.* 221: 520-25, 1995).

5 PRODUCTION OF THE POLYPEPTIDE

According to the present invention, the production of the polypeptide of the present invention can be effected by the culturing of, for example, microbial expression hosts, which have been transformed with one or more polynucleotides of the present invention, in a conventional nutrient fermentation medium. The selection of the appropriate medium may be based on the choice of expression hosts and/or based on the regulatory requirements of the expression construct. Such media are well-known to those skilled in the art. The medium may, if desired, contain additional components favouring the transformed expression hosts over other potentially contaminating micro-organisms.

Thus, the present invention also provides a method for producing a polypeptide having human SEP activity, the method comprising the steps of (a) transforming a host cell with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or a derivative, homologue, variant or fragment thereof; and (b) culturing the transformed host cell under conditions suitable for the expression of said polypeptide.

The present invention also relates to a method for producing a polypeptide having human SEP activity, the method comprising the steps of (a) culturing a host cell that has been transformed with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or a derivative, homologue, variant or fragment thereof under conditions suitable for the expression of said polypeptide; and (b) recovering said polypeptide from the host cell culture.

The present invention also relates to a method for producing a polypeptide having human SEP activity, the method comprising the steps of (a) transforming a host cell with a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or a derivative, homologue, variant or fragment thereof; (b) culturing the transformed host cell under

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

conditions suitable for the expression of said polypeptide; and (c) recovering said polypeptide from the host cell culture.

RIBOZYMES

5

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalysing the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridisation of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by a endonucleolytic cleavage. Within the scope of the invention are engineered hammerhead motif ribozyme molecules that specifically and efficiently catalyse endonucleolytic cleavage of human SEP RNA sequences.

10

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences, GUA, GUU and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site may be evaluated for secondary structural features which may render the oligonucleotide sequence inoperable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by testing accessibility to hybridisation with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

20

Both antisense RNA and DNA molecules and ribozymes of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of RNA molecules. These include techniques for chemically synthesising oligonucleotides such as solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* or *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly can be introduced into cell lines, cells or tissues.

25

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

DETECTION

The presence of the human SEP polynucleotide coding sequence can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation or amplification using probes, portions or
5 fragments of the sequence presented in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides or oligomers based on the human SEP coding sequence to detect transformants containing human SEP DNA or RNA. As used herein "oligonucleotides" or "oligomers" may refer to a nucleic acid sequence of at least about 10 nucleotides and as many as about 60 nucleotides, preferably
10 about 15 to 30 nucleotides, and more preferably about 20-25 nucleotides which can be used as a probe or amplifier. Preferably, oligonucleotides are derived from the 3' region of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of human SEP polypeptide, such as by using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the
15 protein, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on human SEP polypeptides is preferred, but a competitive
20 binding assay may be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton R *et al.* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, USA) and Maddox DE *et al.* (1983, J. Exp. Med., 158:1211).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic and amino acid assays. Means for producing labelled
25 hybridisation or PCR probes for detecting human SEP polynucleotide sequences include oligolabelling, nick translation, end-labelling or PCR amplification using a labelled nucleotide. Alternatively, the human SEP coding sequence, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in
30 the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labelled nucleotides.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

A number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA), Promega (Madison, WI, USA), and US Biochemical Corporation (Cleveland, OH, USA) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced as shown in US-A-4816567.

Additional methods to quantify the expression of a particular molecule include radiolabelling (Melby PC *et al.*, 1993, J. Immunol. Methods, Vol 159, pp. 235-244) or biotinylation (Duplaa C *et al.*, 1993, Annal Biochem., Vol 229, p. 36) nucleotides, co-amplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantification of multiple samples may be speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or calorimetric response gives rapid quantification.

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression should be confirmed. For example, if the human SEP coding sequence is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing human SEP coding regions can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a human SEP coding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of human SEP as well.

Alternatively, host cells which contain the coding sequence for human SEP and express human SEP coding regions may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane-based, solution-based, or chip-based technologies for the detection and/or

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

quantification of the nucleic acid or protein.

ANTIBODIES

- 5 The amino acid sequence of the present invention can also be used to generate antibodies
- such as by use of standard techniques - against the amino acid sequence.

Procedures well known in the art may be used for the production of antibodies to human
SEP polypeptides. Such antibodies include, but are not limited to, polyclonal,
10 monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments and fragments produced by a Fab
expression library. Neutralising antibodies, i.e. those which inhibit biological activity of
human SEP polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, etc.
15 may be immunised by injection with the inhibitor or any portion, variant, homologue,
fragment or derivative thereof or oligopeptide which retains immunogenic properties.
Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological
response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as
aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic
20 polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and
dinitrophenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are
potentially useful human adjuvants which may be employed.

Monoclonal antibodies to the amino acid sequence may be even prepared using any
25 technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell
lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally
described by Köhler and Milstein (1975, *Nature*, Vol 256, pp. 495-497), the human B-cell
hybridoma technique (Koshor *et al.*, (1983), *Immunol. Today*, Vol 4, p. 72; Cote *et al.*,
(1983), *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, Vol 80, pp. 2026-2030)
30 and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, (1985), *Monoclonal Antibodies and
Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc., pp. 77-96). In addition, techniques developed for the
production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al.*, (1984), Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), Vol 81, pp. 6851-6855; Neuberger *et al.*, (1984), Nature, Vol 312, pp. 604-608; Takeda *et al.*, (1985), Nature, Vol 314, pp. 452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US-A-4946779) can be adapted to produce inhibitor-specific single chain antibodies.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al.* (1989, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), Vol 86, pp. 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature, Vol 349, pp. 293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for human SEP may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulphide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al.*, (1989), Science, Vol 256, pp. 1275-1281).

An alternative technique involves screening phage display libraries where, for example, the phage express scFv fragments on the surface of their coat with a large variety of complementarity determining regions (CDRs). This technique is well known in the art.

Human SEP-specific antibodies are useful for the diagnosis of conditions and diseases associated with expression of human SEP polypeptide. A variety of protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the formation of complexes between human SEP polypeptides and its specific antibody (or similar human SEP-binding molecule) and the measurement of complex formation. A two-site, monoclonal based immunoassay utilising monoclonal

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a specific human SEP protein is preferred, but a competitive binding assay may also be employed. These assays are described in Maddox DE *et al.* (1983, Journal of Experimental Medicine, Vol 158, p. 1211).

5

Anti-human SEP antibodies are useful for the diagnosis of disorders involving abnormal peptide signalling or other disorders or diseases characterised by abnormal expression of a human SEP. Diagnostic assays for a human SEP include methods utilising the antibody and a label to detect a human SEP polypeptide in human body fluids, cells, tissues or sections or extracts of such tissues. The polypeptides and antibodies of the present invention may be used with or without modification. Frequently, the polypeptides and antibodies will be labelled by joining them, either covalently or noncovalently, with a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules are known to those of skill in the art.

15

Antibodies may be used in method of detecting polypeptides of the invention present in biological samples by a method which comprises: (a) providing an antibody of the invention; (b) incubating a biological sample with said antibody under conditions which allow for the formation of an antibody-antigen complex; and (c) determining whether antibody-antigen complex comprising said antibody is formed.

20

Depending on the circumstances, suitable samples may include extract tissues such as testis or brain or from neoplastic growths derived from such tissues.

25

Antibodies of the invention may be bound to a solid support and/or packaged into kits in a suitable container along with suitable reagents, controls, instructions and the like.

ASSAYS/IDENTIFICATION METHODS

30

The present invention also relates to an assay method for detecting the presence of human SEP in cells (such as human cells) comprising: (a) performing a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) on RNA (such as total RNA) from such cells using a

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

pair of PCR primers that are specific for human SEP, as determined from the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or an allelic variation thereof; and (b) assaying the appearance of an appropriately sized PCR fragment - such as by agarose gel electrophoresis.

5

The present invention also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that affect (such as inhibit or otherwise modify) the activity of human SEP and/or the expression thereof, the method comprising contacting human SEP or the nucleotide sequence coding for the same with the agent and then measuring the activity of human SEP and/or the expression thereof.

10

The present invention also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that selectively affect (such as selectively inhibit or otherwise selectively modify) the activity of human SEP and/or the expression thereof, the method comprising contacting human SEP or the nucleotide sequence coding for the same with the agent and then measuring the activity of human SEP and/or the expression thereof.

15

The present invention also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that affect (such as inhibit or otherwise modify) the activity of human SEP and/or the expression thereof, the method comprising measuring the activity of human SEP and/or the expression thereof in the presence of the agent or after the addition of the agent in: (a) a cell line into which has been incorporated recombinant DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or an allelic variation thereof, or (b) a cell population or cell line that naturally selectively expresses human SEP. Preferably, the activity of human SEP is determined by the assay method described above.

20

25

The present invention also relates to a method of identifying agents (such as compounds, other substances or compositions comprising the same) that selectively affect (such as inhibit or otherwise modify) the activity of human SEP and/or the expression thereof, the method comprising measuring the activity of human SEP and/or the expression thereof in

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

the presence of the agent or after the addition of the agent in: (a) a cell line into which has been incorporated recombinant DNA comprising the DNA sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or an allelic variation thereof, or (b) a cell population or cell line that naturally selectively expresses human SEP. Preferably, the activity of human SEP is
5 determined by the assay method described above.

The present invention also relates to a method of screening an agent for modulation (preferably for specific modulation) of human SEP (or a derivative, homologue, variant or fragment thereof) activity or the expression of the nucleotide sequence coding for the same (including a derivative, homologue, variant or fragment thereof), the method
10 comprising the steps of: (a) providing a candidate agent; (b) combining human SEP (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) with the candidate agent for a time sufficient to allow modulation under suitable conditions; and
15 (c) detecting modulation of human SEP by the candidate agent (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) in order to ascertain if the candidate agent modulates human SEP (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) activity or the expression of the nucleotide sequence coding for the same (or the
20 derivative, homologue, variant or fragment thereof).

The present invention also relates to a method of screening an agent for specific binding affinity with human SEP (or a derivative, homologue, variant or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (including a derivative, homologue, variant or
25 fragment thereof), the method comprising the steps of: (a) providing a candidate agent; (b) combining human SEP (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) with the candidate agent for a time sufficient to allow binding under suitable conditions; and (c) detecting binding of the candidate agent to human SEP (or the
30 derivative, homologue, variant or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) in order to ascertain if the candidate agent binds to human SEP (or the derivative, homologue, variant or

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof).

The present invention also relates to a method of identifying an agent which is capable of modulating human SEP, the method comprising the steps of: (a) contacting the agent with human SEP (or a derivative, homologue, variant or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof); (b) incubating the mixture of step (a) with a bioactive peptide under conditions suitable for the proteolysis of the bioactive peptide; (c) measuring the amount of bioactive peptide proteolysis; and (d) comparing the amount of bioactive peptide proteolysis of step (c) with the amount of bioactive peptide proteolysis obtained with human SEP (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) or the nucleotide sequence coding for the same (or the derivative, homologue, variant or fragment thereof) incubated without the agent, thereby determining whether the agent affects (such as inhibits or selectively inhibits) bioactive peptide proteolysis.

Thus, in certain embodiments of the present invention, human SEP or a variant, homologue, fragment or derivative thereof and/or a cell line that expresses the human SEP or variant, homologue, fragment or derivative thereof may be used to screen for antibodies, peptides, or other agents, such as organic or inorganic molecules, that act as modulators of endopeptidase activity or for the expression thereof, thereby identifying a therapeutic agent capable of modulating bioactive peptide levels. For example, anti-human SEP antibodies capable of neutralising the activity of human SEP may be used to inhibit human SEP proteolysis of bioactive peptides, thereby increasing their levels. Alternatively, screening of peptide libraries or organic libraries made by combinatorial chemistry with recombinantly expressed human SEP or a variant, homologue, fragment or derivative thereof or cell lines expressing human SEP or a variant, homologue, fragment or derivative thereof may be useful for identification of therapeutic agents that function by modulating (e.g. inhibiting or selectively inhibiting) human SEP proteolysis of bioactive peptides. Synthetic compounds, natural products, and other sources of potentially biologically active materials can be screened in a number of ways deemed to be routine to those of skill in the art. For example, nucleotide sequences encoding the N-terminal

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

region of human SEP may be expressed in a cell line, which can be used for screening of allosteric modulators, either agonists or antagonists, of human SEP activity. Alternatively, nucleotide sequences encoding the conserved catalytic domain of human SEP can be expressed in cell lines and used to screen for inhibitors or selective inhibitors of bioactive peptide proteolysis.

The ability of a test agent to interfere with human SEP activity or bioactive peptide proteolysis may be determined by measuring human SEP levels or bioactive peptide levels.

Accordingly, the present invention relates to a method of identifying a compound which is capable of modulating the bioactive peptide proteolysis activity of a human SEP, or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, comprising the steps of (a) contacting the compound with a human SEP, or a variant, homologue, fragment or derivative thereof; (b) incubating the mixture of step (a) with a bioactive peptide under conditions suitable for the proteolysis of the bioactive peptide; (c) measuring the amount of bioactive peptide proteolysis; and (d) comparing the amount of bioactive peptide proteolysis of step (c) with the amount of bioactive peptide proteolysis obtained with the human SEP, or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, incubated without the compound, thereby determining whether the compound stimulates or inhibits bioactive peptide proteolysis. In one embodiment of the method, the fragment may be from the N-terminal region of the human SEP and provides a method to identify allosteric modulators of the human SEP. In another embodiment of the present invention, the fragment may be from the carboxy terminal region of the human SEP and provides a method to identify inhibitors or selective inhibitors of bioactive peptide proteolysis.

The bioactive peptides may be full-length or fragments thereof and may be produced recombinantly or, preferably, synthetically. Preferably, said bioactive peptides are small synthetic peptides capable of being modulated (preferably cleaved by proteolysis/hydrolysis) by human SEP. More preferably, said synthetic peptides are labelled (preferably, fluorescently labelled, more preferably fluorescently labelled with intramolecularly quenchable fluorogenic dyes such as can be used in the FRET assay

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

described herein).

Since human SEP may be involved in regulating bioactive peptide activity and/or in proteolysis of biologically inactive peptides into their active form, references to
5 "bioactive peptide(s)" (and the like) hereinabove can also be taken to mean references to "biologically inactive peptide(s)" (and the like), with the context within which these references exist to be construed *mutatis mutandis*, as appropriate. For example, where the inhibition of human SEP activity might lead to increased levels of bioactive peptide(s), such inhibition might also, or instead, lead to increased levels of biologically inactive
10 peptide(s), thereby leading to reduced levels of peptide(s) in their "active form".

A human SEP polypeptide, its immunogenic fragments or oligopeptides thereof can be used for screening therapeutic compounds in any of a variety of drug screening techniques. The polypeptide employed in such a test may be free in solution, affixed to a
15 solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The abolition of activity or the formation of binding complexes between a human SEP polypeptide and the agent being tested may be measured.

Accordingly, the present invention relates to a method for screening one or a plurality of
20 compounds for modulation (preferably specific modulation, such as specific binding affinity or inhibition) of human SEP or the expression thereof, or a portion thereof or variant, homologue, fragment or derivative thereof, comprising providing one or a plurality of compounds; combining a human SEP or a nucleotide sequence coding for the same or a portion thereof or variant, homologue, fragment or derivative thereof with the
25 or each of a plurality of compounds for a time sufficient to allow modulation under suitable conditions; and detecting, for example, (i) binding of a human SEP, or portion thereof or variant, homologue, fragment or derivative thereof, to each of the plurality of compounds, thereby identifying the compound or compounds which modulate a human SEP or a nucleotide sequence coding for the same; or (ii) inhibition of a human SEP, or
30 portion thereof or variant, homologue, fragment or derivative thereof, by each of the plurality of compounds, thereby identifying the compound or compounds which modulate (inhibit) a human SEP or a nucleotide sequence coding for the same. In such an assay,

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

the plurality of compounds may be produced by combinatorial chemistry techniques known to those of skill in the art.

Another technique for drug screening provides for high throughput screening (HTS) of compounds having suitable binding affinity to the human SEP polypeptides and is based upon the method described in detail in Geysen, WO 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with human SEP fragments and washed. A bound human SEP is then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified human SEP can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a human SEP specifically compete with a test compound for binding a human SEP. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with a human SEP.

The assay method of the present invention may be a high throughput screen (HTS). In this regard, the teachings of WO 84/03564 may be adapted for the human SEP of the present invention.

The teachings of US-A-5738985 may be adapted for the assay method of the present invention.

AGENTS

The present invention also provides one or more agents identified by the assays methods and identification methods of the present invention.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The agent of the present invention can be, for example, an organic compound or an inorganic compound. The agent can be, for example, a nucleotide sequence that is antisense to all or part of the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5. Preferably, the agent will be a modulator of SEP activity, more preferably a SEP inhibitor (SEPi) or a selective SEPi.

A SEPi is a compound which inhibits the enzymatic activity of SEP, that is prevents it cleaving (by proteolysis) a substrate peptide, polypeptide or protein.

10 The invention further provides an agent of the present invention (or even a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a pharmaceutically acceptable solvate thereof) or a pharmaceutical composition containing any of the foregoing, for use as a medicament.

15 The present invention also relates to the use of an agent to affect human SEP activity (such as to inhibit, selectively inhibit, modulate or agonise) in any one or more of the urogenital system, cardiovascular system, the neurological system, and the endocrine system.

20 DIAGNOSTICS

The present invention also provides a diagnostic composition for the detection of human SEP polynucleotide sequences. The diagnostic composition may comprise the sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, or a sequence capable of hybridising to all or part of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 or an allelic variation thereof.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease, normal or standard values from a human SEP polypeptide expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts (e.g. from the testis) taken from normal subjects, either animal or human, with antibody to a human SEP polypeptide under conditions suitable for complex formation which are well known in the art. The amount of standard

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

complex formation may be quantified by comparing it to a dilution series of positive controls where a known amount of antibody is combined with known concentrations of a purified human SEP polypeptide. Then, standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected
5 by a disorder or disease related to a human SEP polypeptide expression. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state.

A human SEP polynucleotide, or any part thereof, may provide the basis for a diagnostic and/or a therapeutic compound. For diagnostic purposes, human SEP polynucleotide
10 sequences may be used to detect and quantify gene expression in conditions, disorders or diseases in which human SEP activity may be implicated.

Human SEP encoding polynucleotide sequence may be used for the diagnosis of diseases resulting from expression of human SEP. For example, polynucleotide sequences
15 encoding human SEP may be used in hybridisation or PCR assays of tissues from biopsies or autopsies or biological fluids, such as serum, synovial fluid or tumour biopsy, to detect abnormalities in human SEP expression. The form of such qualitative or quantitative methods may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin or chip technologies; and
20 ELISA or other multiple sample format technologies. All of these techniques are well known in the art and are, in fact, the basis of many commercially available diagnostic kits.

Such assays may be tailored to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment
25 regime and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for the diagnosis of disease, a normal or standard profile for human SEP expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with human SEP or a portion thereof, under conditions suitable
30 for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of positive controls run in the same experiment where a known amount of purified human SEP is

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

used. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to expression of the human SEP coding sequence. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state. If disease is established, an existing therapeutic agent is administered, and treatment profile or values may be generated. Finally, the assay may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

10

The present invention also relates to the use of a human SEP polypeptide, or variant, homologue, fragment or derivative thereof, to produce anti-human SEP antibodies which can, for example, be used diagnostically to detect and quantify human SEP levels in disease states.

15

The present invention further relates to diagnostic assays and kits for the detection of human SEP in cells and tissues comprising a purified human SEP which may be used as a positive control, and anti-human SEP antibodies. Such antibodies may be used in solution-based, membrane-based, or tissue-based technologies to detect any disease state or condition related to the expression of human SEP protein or expression of deletions, variants, homologues, fragments or derivatives thereof.

20

PROBES

Another aspect of the subject invention is the provision of nucleic acid hybridisation or PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding human SEP coding region or closely related molecules, such as alleles. The specificity of the probe, i.e. whether it is derived from a highly conserved, conserved or non-conserved region or domain, and the stringency of the hybridisation or amplification (high, intermediate or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring human SEP coding sequence, or related sequences. Probes for the detection of related nucleic acid sequences are selected from conserved or highly

25

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

conserved nucleotide regions of human SEP family members, such as the 3' region, and such probes may be used in a pool of degenerate probes. For the detection of identical nucleic acid sequences, or where maximum specificity is desired, nucleic acid probes are selected from the non-conserved nucleotide regions or unique regions of human SEP polynucleotides. As used herein, the term "non-conserved nucleotide region" refers to a nucleotide region that is unique to the human SEP coding sequence disclosed herein and does not occur in related family members, such as known SEPs.

PCR, as described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188 provides additional uses for oligonucleotides based upon the human SEP sequence. Such oligomers are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'→3') and one with antisense (3'←5') employed under optimised conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

The nucleic acid sequence for human SEP can also be used to generate hybridisation probes as previously described, for mapping the endogenous genomic sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. These include *in situ* hybridisation to chromosomal spreads (Verma *et al.* (1988) *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York City, USA), flow-sorted chromosomal preparations, or artificial chromosome constructions such as yeast artificial chromosomes (YACs), bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial P1 constructions or single chromosome cDNA libraries.

In situ hybridisation of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers are invaluable in extending genetic maps. Examples of genetic maps can be found in Science (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f). Often the placement of a gene on the chromosome of another

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

mammalian species may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once a disease or syndrome, such as ataxia telangiectasia (AT), has been crudely localised by genetic linkage to a particular genomic region, for example, AT to 11q22-23 (Gatti *et al.*, (1988), Nature, 336:577-580), any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc. between normal, carrier or affected individuals.

PHARMACEUTICALS

15 The present invention also provides a pharmaceutical composition for treating an individual in need of the same due to human SEP activity, the composition comprising a therapeutically effective amount of an agent that affects (such as inhibits or selectively inhibits) said activity and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

20 Thus, the present invention also covers pharmaceutical compositions comprising the agents of the present invention (an agent capable of modulating the expression pattern of the nucleotide sequence of the present invention or the activity of the expression product thereof and/or an agent identified by an assay according to the present invention). In this regard, and in particular for human therapy, even though the agents of the present invention can be administered alone, they will generally be administered in admixture

25 with a pharmaceutical carrier, excipient or diluent selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice.

By way of example, in the pharmaceutical compositions of the present invention, the agents of the present invention may be admixed with any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), or solubilising agent(s).

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

In general, a therapeutically effective daily oral or intravenous dose of the agents of the present invention is likely to range from 0.01 to 50 mg/kg body weight of the subject to be treated, preferably 0.01 to 20 mg/kg, more preferably 0.1 to 20 mg/kg. The agents of the present invention may also be administered by intravenous infusion, at a dose which
5 is likely to range from 0.001-10 mg/kg/hr.

Thus, the present invention also provides a method of treating an individual in need of the same due to human SEP activity comprising administering to said individual an effective amount of the pharmaceutical composition of the present invention.

10

Typically, the physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual patient and it will vary with the age, weight, sex and response of the particular patient. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited, and such
15 are within the scope of this invention.

Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets
20 containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intracavernosally, intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous
25 solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

30 For oral, parenteral, buccal and sublingual administration to subjects (such as patients), the daily dosage level of the agents of the present invention may typically be from 10 to 500 mg (in single or divided doses). Thus, and by way of example, tablets or capsules

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

may contain from 5 to 100 mg of active agent for administration singly, or (two or more at a time, as appropriate. It is also possible to administer the agents of the present invention in sustained release formulations.

- 5 In some applications, generally in humans, oral administration of the agents of the present invention is the preferred route, being the most convenient and can in some cases avoid disadvantages associated with other routes of administration - such as those associated with intracavernosal (i.c.) administration. In circumstances where the recipient suffers from a swallowing disorder or from impairment of drug absorption after oral
10 administration, the drug may be administered parenterally.

- For veterinary use, the agent of the present invention is typically administered as a suitably acceptable formulation in accordance with normal veterinary practice and the veterinary surgeon will determine the dosing regimen and route of administration which
15 will be most appropriate for a particular animal. However, as with human treatments, it may be possible to administer the agent alone for veterinary treatments.

- Typically, the pharmaceutical compositions - which may be for human or animal usage - will comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient. The choice of pharmaceutical carrier, excipient or diluent can be selected with
20 regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. As indicated above, the pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s) or solubilising agent(s).

- 25 In some embodiments of the present invention, the pharmaceutical compositions will comprise one or more of: an agent that has been screened by an assay of the present invention; an agent that is capable of interacting with any one of the sequences shown in the Sequence Listing or Figures including derivatives, fragments, homologues or variants
30 thereof or sequences capable of hybridising to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Included in the scope of the invention are oligonucleotide sequences, antisense RNA and DNA molecules and ribozymes, which function to destabilise human SEP mRNA or inhibit translation of a human SEP. Such nucleotide sequences may be used in conditions where it would be preferable to increase levels of bioactive peptides.

5

A human SEP antisense molecule may provide the basis for the prophylaxis and/or treatment of various abnormal conditions related to, for example, increased human SEP activity.

10 A human SEP nucleic acid antisense molecule may be used to block the activity of the human SEP in conditions where it would be preferable to elevate bioactive peptide levels.

Expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may be used for delivery of recombinant human SEP sense or antisense molecules to the targeted cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant vectors containing human SEP. Alternatively, recombinant human SEP can be delivered to target cells in liposomes.

20 The full length cDNA sequence and/or its regulatory elements enable researchers to use human SEP as a tool in sense (Yousoufian H and H F Lodish, (1993), Mol. Cell Biol., 13:98-104) or antisense (Eguchi *et al*, (1991), Annual Rev. Biochem., 60:631-652) investigations of gene function. Oligonucleotides, designed from the cDNA or control sequences obtained from the genomic DNA can be used *in vitro* or *in vivo* to inhibit expression. Such technology is now well known in the art, and sense or antisense oligonucleotides or larger fragments can be designed from various locations along the coding or control regions. Appropriate oligonucleotides, which can be 20 nucleotides in length, may be used to isolate human SEP sequences or closely related molecules from human libraries.

25

30 Additionally, human SEP expression can be modulated by transfecting a cell or tissue with expression vectors which express high levels of a human SEP fragment in conditions

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

where it would be preferable to block endopeptidase activity thereby increasing bioactive peptide levels. Such constructs can flood cells with untranslatable sense or antisense sequences. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors may continue to transcribe RNA molecules until all copies of the vector are disabled by endogenous
 5 nucleases. Such transient expression may last for a month or more with a non-replicating vector and even longer if appropriate replication elements are part of the vector system.

Since human SEP may be involved in regulating bioactive peptide activity and/or in proteolysis of biologically inactive peptides into their active form, references to
 10 "bioactive peptide(s)" (and the like) hereinabove can also be taken to mean references to "biologically inactive peptide(s)" (and the like), with the context within which these references exist to be construed *mutatis mutandis*, as appropriate. For example, where the inhibition of human SEP activity might lead to increased levels of bioactive peptide(s), such inhibition might also, or instead, lead to increased levels of biologically inactive
 15 peptide(s), thereby leading to reduced levels of peptide(s) in their "active form".

Modifications of gene expression can be obtained by designing antisense sequences to the control regions of the human SEP gene, such as the promoters, enhancers, and introns.

20 Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g. between -10 and +10 regions of the leader sequence, are preferred. Antisense RNA and DNA molecules may also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes. Similarly, inhibition can be achieved using Hogeboom base-pairing methodology, also known as "triple helix" base pairing. Triple helix pairing
 25 compromises the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules.

Thus the invention provides a pharmaceutical composition comprising an agent of the present invention (or even a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a
 30 pharmaceutically acceptable solvate thereof) together with a pharmaceutically acceptable diluent, excipient or carrier.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

The pharmaceutical composition could be for veterinary (i.e. animal) usage or for human usage.

Thus, the present invention therefore also relates to pharmaceutical compositions comprising effective amounts of inhibitors or antagonists of human SEP protein (including antisense nucleic acid sequences) in admixture with a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient (including combinations thereof).

The present invention yet further relates to pharmaceutical compositions which may comprise all or portions of human SEP polynucleotide sequences, human SEP antisense molecules, human SEP polypeptides, protein, peptide or organic modulators of human SEP bioactivity, such as inhibitors, selective inhibitors, antagonists (including antibodies) or agonists, alone or in combination with at least one other agent, such as stabilising compound, and may be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water.

PHARMACEUTICAL COMBINATIONS

The pharmaceutical compositions of the present invention may be used in combination with one or more other pharmaceutically active agents, such as a potentiators or enhancers of cyclic GMP (such a phosphodiesterase type 5 inhibitor e.g. Sildenafil, or a nitric oxide donor, or a nitric oxide precursor e.g. L-argininase) and/or a centrally acting pharmaceutical (e.g. a dopamine receptor agonist or melanocortin receptor agonist, such as apomorphine or melanotan II). Teachings on the use of apomorphine as a pharmaceutical may be found in US-A-5945117. In that particular document, apomorphine is delivered sub-lingually.

In addition, or in the alternative, the pharmaceutical compositions of the present invention may be used in combination with: one or more of a neutral endopeptidase (NEP) inhibitor (NEPi), one or more of a PDE5 inhibitor (PDE5i) (e.g. sildenafil (Pfizer), vardenafil (Bayer BA 38-9456) and IC351 (Cialis, Icos Lilly)), one or more of an NPY receptor antagonist, one or more of a PDE type 2 inhibitor, one or more of a nitric oxide (NO)

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

donor (e.g. NMT-921), one or more of a dopamine receptor agonist (e.g. apomorphine, Uprima, Lxseue), one or more of a melanocortin receptor agonist (e.g. Melanotan II or PT14), one or more of a potassium channel opener (e.g. a K_{ATP} channel opener (e.g. minoxidil, nicorandil) and/or a calcium activated potassium channel opener (e.g. BMS-204352), one or more of a $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonist (e.g. phentolamine, Vasofem, Vasomax), one or more of a VIP receptor agonist or VIP analogue (e.g. Ro-125-1553) or VIP fragments, one or more of a $\alpha 2$ -adrenoceptor antagonist with VIP combination (e.g. Invicorp, Aviptadil), one or more of a $\alpha 2$ -adrenoceptor antagonist (e.g. yohimbine), one or more of an estrogen, estrogen and medroxyprogesterone or medroxyprogesterone acetate (MPA) or oestrogen and methyl testosterone hormone replacement therapy agent (e.g. HRT especially Premarin, Cencetin, Oestrofeminal, Equin, Estrace, Estrofem, Elleste Solo, Estring, Estraderm, Estraderm TTS, Estraderm Matrix, Dermestril, Premphase, Prempro, Prempak, Premique, Estratest, Estratest HS, Tibolone), one or more of a testosterone replacement agent (including DHEA (dehydroandrostendione), testosterone (Tostrelle) or a testosterone implant (Organo)), one or more of a testosterone/oestradiol agent, one or more of an estrogen agonist (e.g. Lasofoxifene), one or more of a serotonin receptor agonist or antagonist (e.g. $5HT_{1A}$, $5HT_{2C}$, $5HT_{2A}$ and $5HT_7$ receptor agonists and antagonists; as described in WO 00/28993), one or more of a prostanoïd receptor agonist (e.g. Muse, alprostadil, misoprostol), one or more of a purinergic receptor agonist (especially P2Y2 and P2Y4), or one or more antidepressant agents (e.g. bupropion (Wellbutrin), mirtazapine, nefazodone).

Preferably, said pharmaceutical composition of the present invention used in such combinations described above is a SEPI. Preferred combinations of the present invention are: SEPI + NEPI and SEPI + PDE5i, in particular SEPI + Sildenafil.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

GENERAL METHODOLOGY REFERENCES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference
may be made in particular to Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual
5 (1989) and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John
Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-
4965188.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

DEPOSIT

The following sample was deposited in accordance with the Budapest Treaty at the recognised depositary The National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB) at 23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, AB24 3RY, United Kingdom on 29 June 2001:

NCIMB number NCIMB 41110 is *E. coli* MSSE82.

10 The depositor was Pfizer Limited, Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ, United Kingdom.

One skilled in the art could readily grow the above-mentioned *E. coli* clone (NCIMB 41110) in Luria Broth containing ampicillin and isolate the plasmid DNA of the clone using the alkali lysis method as described in Sambrook, *et al.*, eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. The dideoxy termination method as described by Sanger *et al.* (Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), (Dec. 1977), 74(12):5463-5467) and modified by Applied Biosystems, Foster City, CA, USA (see Applied Biosystems manufacturer's literature) for fluorescent detection could then be used to sequence the DNA and identify human SEP.

The terms "cell" or "cells" used herein when referring to the above-mentioned deposited biological material deposited under Accession Number NCIMB 41110 are interchangeable with the equivalent terms "micro-organism" or "micro-organisms" or "bacterium" or "bacteria".

The present invention also encompasses sequences derivable and/or expressable from that deposit and embodiments comprising the same. The present invention also encompasses partial sequences derivable and/or expressable from that deposit and embodiments comprising the same, wherein those partial sequences code for active polypeptides (active enzymatic sites). The present invention also encompasses proteins comprising sequences derivable and/or expressable from that deposit and embodiments comprising the same. The

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

present invention also encompasses proteins comprising partial sequences derivable and/or expressible from that deposit and embodiments comprising the same, wherein those partial sequences code for active polypeptides (active enzymatic sites).

5 INTRODUCTION TO THE EXAMPLES SECTION, THE FIGURES AND THE
SEQUENCE LISTING

The present invention will now be described, by way of example only, with reference to the accompanying Figures and Sequence Listing, in which:-

10

Figure 1 shows an analysis of open reading frames (ORFs) of human SEP cDNA sequence.

Figure 2 shows a comparison of human SEP to most closely related human proteins by pairwise alignment from the blastp algorithm.

15

Figure 3 shows a comparison of human, rat and mouse sequences for SEP by pairwise alignment from blastp (protein) and fasta (coding nucleotide) algorithms.

Figure 4 shows multiple alignment of human SEP and related human proteins showing catalytic domain.

20

Figure 5 shows multiple alignment of human, rat and mouse SEP proteins showing catalytic domain.

25

Figure 6 shows multiple alignment of human, rat and mouse SEP coding sequence showing catalytic domain.

Figure 7 shows a phylogenetic analysis by Neighbour-Joining Distance method expressed as a radial tree derived from multiple alignment of whole SEP-like proteins.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Figure 8 shows a phylogenetic analysis by Neighbour-Joining Distance method expressed as a radial tree derived from the catalytic domain region of the multiple alignment.

5 SEQ ID NO: 1 shows the nucleotide sequence (cDNA) coding for human SEP.

SEQ ID NO: 2 shows human SEP protein predicted from translation of cDNA sequence in +1 open reading frame.

10 SEQ ID NOS: 3 and 4 show oligonucleotide primer sequences used in the identification of the nucleotide sequence (cDNA) coding for human SEP.

SEQ ID NO: 5 shows the nucleotide sequence (cDNA) coding for human SEP - including 5' and 3' partial vector sequences (highlighted).

15

Experimental section

EXAMPLE 1 - IDENTIFICATION OF HUMAN SEP

20

Database Mining

The novel gene of human SEP was found by mining databases of human expressed sequence tags (ESTs) using the neprilysin protein as probe and the BLAST algorithm.

25 EST hits (database = Incyte Gold™; gene id. = 241161) were then assembled into contiguous sequence which predicted a large fragment of coding sequence. This corresponds to the catalytic domain by homology with the neprilysin protein sequence (60% identity). Probes for PCR cloning were designed using this region of the predicted coding sequence for the novel gene. Thereafter, further mining of unfinished sequence
30 from the human genomic database identified 5 predicted exons, which were hypothesised to belong to the same novel gene in the missing N-terminal region. This was later confirmed following sequencing of the full length clone obtained from human testis

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

library (see below).

The novel human SEP sequence includes 3' UTR and part of the coding sequence in the highly conserved C-terminal region of human SEP which contains one of the two active
 5 catalytic sites. The novel human SEP appears to contain an insert of 37 amino-acids.

Isolation of full length human SEP cDNA

An oligonucleotide (5'-ctgtcttgatggatggatg-3') was designed using partial human SEP
 10 cDNA sequence from the above mentioned assembly of contiguous expression sequence
 tags (ESTs) that would enable longer human SEP cDNAs to be amplified from cDNA
 libraries using 5'-RACE (rapid amplification of 5' cDNA ends) PCR.

A panel of 12 arrayed 96-well format human Rapid-Screen™ cDNA libraries were then
 15 screened by 5'-RACE PCR. cDNAs corresponding to human SEP were identified in
 libraries derived from brain, liver, placenta, small intestine, and testis.

None of these cDNAs were full length, so further 5'-RACE was performed on the panel
 of libraries using a primer (5'-gacctggcagtcgaattctcc-3') designed from the sequence of
 20 one of the longer, but partial length cDNAs from testis. This identified a longer (~ 3.0
 kb), putative full length cDNA clone in the testis library which was isolated and
 sequenced from both ends. The full length human SEP clone was termed MSSE82 (and
 was deposited at NCIMB under Accession Number NCIMB 41110), with the full length
 cDNA cloned into the pCMV6-XL4 vector which has Genbank accession number
 25 #AF067196.

EXAMPLE 2 - TISSUE DISTRIBUTION OF HUMAN SEP mRNA

A multiple tissue messenger RNA blot was probed for human SEP. SEP mRNA was
 30 detected in a testis sample but not in other tissues.

A fragment of DNA corresponding to the entire human SEP coding sequence was

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

amplified by PCR using the SEP clone MSSE82 as a template. The fragment was radiolabelled with ³²P dCTP using a megaprime kit (Amersham PLC, UK). The radiolabelled fragment was used as a hybridisation probe to screen a multiple tissue mRNA array (dot blot) (from Clontech, USA) containing mRNAs from a selection (76) of different human tissues and cell lines. Following hybridisation and washing, the blot was subjected to autoradiography. A signal was detected from the testis, but not other tissues.

EXAMPLE 3 - PRODUCTION OF RECOMBINANT SEP ENZYME

A culture of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells is transfected with the plasmid MSSE82 using the lipofectamine method as described in the lipofectamine reagent protocol (Invitrogen Ltd, Paisley, UK). The cell media is harvested at 24 or 48 hours post-transfection, and cleared of cell debris by centrifugation at 3000g for 5 min. The media is then dialyzed overnight at 4° C against 50mM HEPES pH7.4/10% glycerol, using a "slide a lyser" (from Pierce and Warner, Chester UK). The dialyzed sample is then frozen in aliquots and stored under liquid nitrogen.

EXAMPLE 4 - ASSAY OF SEP PEPTIDASE ACTIVITY

SEP assay

Background

The SEP assay is based on a FRET assay developed by Carvalho *et al.* for use with NEP (Carvalho *et al.*, *Annal. Biochem.* 237, pp. 167-173 (1996)). The SEP FRET assay utilises a similar, although not identical, intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrate, but substituted with a novel combination of fluorogenic donor/acceptor dyes, specifically Rhodamine green (Molecular Probes, Inc.) and QSY7 (Molecular Probes, Inc.).

The endopeptidase activity of SEP is measured by monitoring its ability to proteolyse the

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

synthetic peptide substrate Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)-βAla-NH₂.

The two fluorophores (fluorogenic dyes) chosen for this assay have overlapping emission and absorption spectra and hence are suitable for energy transfer. The Rhodamine green acts as a donor and when excited at 485 nm gives out an emission (fluorescence) at 535 nm which in turn excites the QSY7 (FRET is occurring). The QSY7 is fluorescently silent and so gives off no emission above 535 nm hence no signal is observed (the Rhodamine green emission is quenched).

Upon cleavage (selective hydrolysis) by SEP at the Arg-Val peptide bond of the peptide substrate, the Rhodamine green and QSY7 moieties move apart and so upon excitation at 485 nm, energy transfer can no longer take place. As a result, an increase in fluorescence is observed at 535 nm for the Rhodamine green.

Preparation of the synthetic peptide substrate Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)-βAla-NH₂

Experimental:

Peptide assembly was completed on 0.25mmol Fmoc-PAL-PEG-PS resin by solid phase peptide synthesis protocols using modifications to manufacturer supplied (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-based synthesis cycles. Our modified cycles deprotect the amino terminus with 2x5minute treatments with 20% piperidine / N-methylpyrrolidinone (NMP); the efficiency of which is monitored by UV absorbance at 301nm by passage of a small aliquot of deprotection solution through a UV absorbance detector. In a separate cartridge, the incoming amino acid is activated with 0.9 equivalents each of 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) / 1-Hydroxybenzotriazole (HOBt) dissolved in N,N-dimethylformamide (DMF). 2 equivalents of diisopropylethyl amine (DIEA) are added. Concurrently, the resin is then washed with NMP to remove deprotection by-products. The wash solution is drained from the resin and the activated amino acid ester is transferred to the resin and stirred to allow coupling to the amino

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

terminus for 20 minutes. The residual coupling solution is drained and the resin washed again with NMP. To ensure peptide homogeneity, a solution of 0.4M Acetic Anhydride / 0.04M HOBt in NMP and 12mmole DIEA are added to the resin to acetylate any potential unreacted sites. Finally, the resin is washed with NMP, drained, then washed
 5 with a mixture of 1:1 dichloromethane / 2,2,2-trifluoroethanol and drained. This typifies one cycle of peptide synthesis. The completed synthesis resin was cleaved and deprotected using Reagent K (King, D.S. et al., (1990), *Int. J. Pep. Prot. Res.*, 36, pp. 255-66) affording 251mg (100%) crude peptide **CP1** Electrospray mass spectrometry (ESMS) (m/z calculation (calc.) = 977.21 (MH⁺ average), obs. = 977.47).

10

Attachment of QSY-7 to Cysteine:

50mg (51μmol) of crude **CP1** was dissolved in solution of 10% DIEA / DMF containing 45mg (52.4μmol) QSY-7 maleimide. After 10 minutes, the reaction was judged to be incomplete via HPLC-MS analysis and an additional 30mg (30.7μmol) crude peptide was
 15 added. After 30 additional minutes, the reaction was judged via HPLC-MS to be complete and all starting reagents consumed. The product was isolated by C18 preparative HPLC chromatography and fractions exhibiting desired product molecular weight by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization mass spectrometry (MALDI-MS) were pooled and lyophilized to 73.7mg (50%) of a purple powder, **CP2** ESMS (m/z calc. = 1797.86 (MH⁺ monoisotopic), obs. = 1797.86).

20

Attachment of bis(trifluoroacetyl) Rhodamine Green to the amino terminus:

73.7mg (41μmol) of **CP2** was dissolved in a 2% DIEA/DMF solution containing 35mg (52.8μmol) Rhodamine Green carboxylic acid, trifluoroacetamide, succinimidyl ester
 25 (5(6)-CR 110 TFA, SE) *mixed isomers*. After 2 hours, the reaction was judged to be complete via HPLC-MS analysis. The product was isolated via C4 preparative HPLC chromatography and fractions exhibiting desired product molecular weights (MALDI-MS) were pooled and lyophilized to 71.4mg (74%) of a purple powder **CP3** ESMS (m/z calc. = 2345.92 (MH⁺ monoisotopic), obs. = 2345.47).

30

Removal of trifluoroacetyl protecting groups from Rhodamine Green:

71.4mg (30.4μmol) of **CP3** was dissolved in 10ml 4:1 CH₃CN/H₂O. To this was added

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

200mg (1886 μ mol) Na₂CO₃. After 16hr. vortexing, the supernatant was decanted from the insoluble material. The reaction vessel was rinsed with 1ml DMSO; this was combined with the supernatant and the product isolated via C4 preparative HPLC chromatography. Fractions exhibiting product molecular weights (MALDI-MS) were
 5 combined and lyophilized to 64mg (98%) of a purple powder, CP4 ESMS (*m/z* calc. = 2155.54 (MH⁺ average), obs. = 2155.27). CP4 is the desired synthetic peptide substrate Rhodamine green-Gly-Gly-dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)- β Ala-NH₂.

Materials:

10 All reagents were purchased of the highest commercial purity available and were used without further refinement. All reagents for peptide synthesis were purchased from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA with the following exceptions: QSYTM-7 maleimide (Catalog number Q-10257) and Rhodamine Green carboxylic acid, trifluoroacetamide, succinimidyl ester (5(6)-CR 110 TFA, SE) *mixed isomers* (Catalog
 15 number R-6112) were purchased from Molecular Probes, Inc., OR, USA; FMOC-PAL-PEG-PS was purchased from Perseptive Biosystems, MA, USA (Catalog number GEN913384); FMOC-B-Alanine and FMOC-d-phenylalanine were purchased from Novabiochem, CA, USA; FMOC-Arg(Pbf)-OH was purchased from AnaSpec, Inc., CA, USA; 2,2,2-Trifluoroethanol was purchased from Aldrich, WI, USA. Sodium Carbonate
 20 was purchased from Fisher, PA, USA.

Preparative HPLC chromatography was performed on Vydac (CA, USA) C18 (Catalog number 218TP1022) or C4 (Catalog number 214TP1022) columns at 10 ml/min flow rate eluting with a linear gradient of 0% to 80%(A=5% CH₃CN / 0.1% TFA / 94.9% H₂O,
 25 B=100% CH₃CN) over 30 minutes collecting 30 second time fractions. Analytical HPLC-MS was performed using a Micromass (Manchester, UK) LCT mass spectrometer (masses based on externally calibrated standards) coupled with a Waters (MA, USA) 2690 HPLC inlet and a Waters 996 photodiode array detector performing chromatography on a Vydac C4 (Catalog number 214TP5415) column with a linear
 30 gradient of 0% to 80%(A=5% CH₃CN / 0.1% TFA / 94.9% H₂O, B=100% CH₃CN) over 30 minutes at 1 ml/min flow rate. Deconvoluted molecular weights were calculated from multiply charged observed ions using Micromass transform software. MALDI-MS were

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

obtained on a Perseptive Biosystems Voyager-DE linear mass spectrometer using alpha cyano 4-hydroxy cinnamic acid matrix (Hewlett Packard, CA, USA) and reported masses based on external calibration.

5 Process (including chemical structures):

CP4 (= synthetic peptide substrate Rhodamine green-Gly-Gly- α Pho-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSYTM-7)-BAla-NH₂) is synthesized by incorporating the key intermediate **CP3** in a solid phase peptide synthesis scheme.

10

Scheme 1:

PCIT/IB01/01263

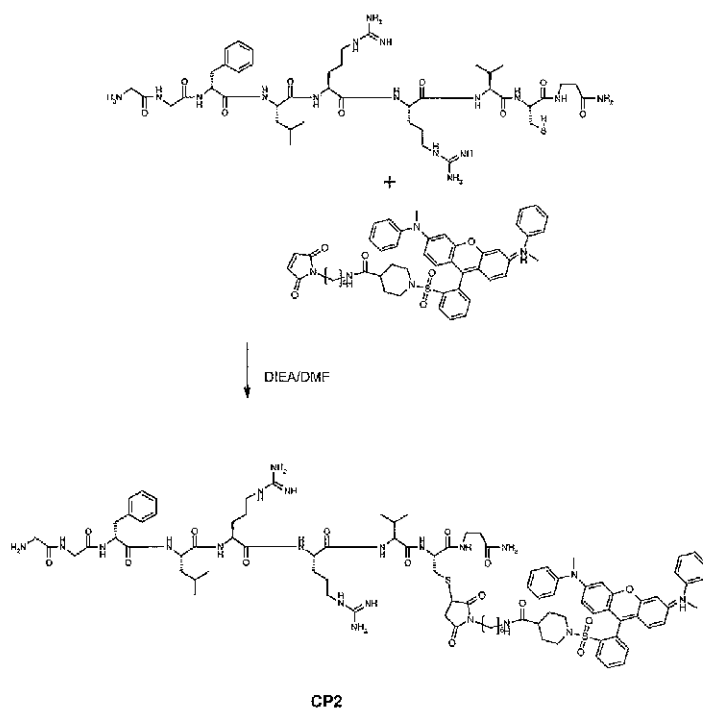


4

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

CP2 is synthesized (full details *supra*) according to Scheme 2:

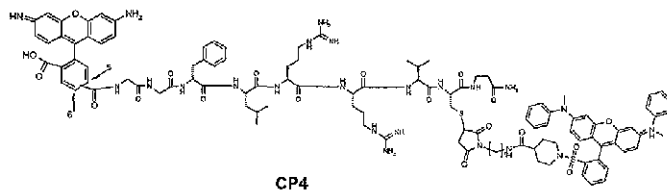


5

Following this incorporation of the QSY-7 tag, the second fluorophore, Rhodamine Green is added as the bis-trifluoroacetyl protected dye according to Scheme 3:

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

*Assay*

5

Reagents for the assay are first prepared as follows:

A substrate solution is made up by resuspending the substrate Rhodamine green-Gly-Gly-
 dPhe-Leu-Arg-Arg-Val-Cys(QSY7)-βAla-NH₂ in 50mM HEPES buffer pH7.4 (Sigma,
 10 UK) at a concentration of 2μM, then adding 1 EDTA-free protease inhibitor cocktail
 tablet (Roche Diagnostics, UK) per 25ml.

An aliquot of SEP enzyme described above is thawed then diluted in 50mM HEPES,
 pH7.4 by a predetermined factor specific to each enzyme batch, such that 50μl contains
 15 sufficient enzyme to convert approximately 30% of substrate to product during the assay.

A 4% DMSO solution comprised of 4ml DMSO plus 96ml 50mM HEPES pH7.4 is
 prepared.

20 A product solution is prepared by adding 500μl of substrate solution to 250μl enzyme
 solution plus 250μl of 4% DMSO solution, and incubating at 37°C for 16 hours.

Assays are set up as follows:

25 In a black 96 well microtitre plate, 100μl of substrate solution is added to 50μl of 4%
 DMSO solution. A similar non-specific background blank is also set up in which the 50μl

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

of 4% DMSO solution additionally contains 40µM phosphoramidon. 50µl of enzyme solution is added to the assay and blank, and the 96 well plate placed in a BMG galaxy fluorescence reader, operating with the Biolise software package (BMG Lab technologies, Offenber, Germany).

5

The plate is incubated in the fluorescence reader for 1 hour at 37°C and a fluorescence measurement taken every 3 minutes (Excitation (Ex) 485 nm / Emission (Em) 535 nm). The proteolytic activity of SEP corresponds to the rate of increase in fluorescence of the sample - rate of increase in fluorescence units of the non-specific background blank. The maximum velocity measurement (MaxV) calculated by the software over four successive readings is used for this calculation.

10

A fluorescence measurement taken from 200µl of product in a well on an identical microtitre plate is taken. If required this value is used, together with the measured fluorescence units from the 60 min timepoint of the SEP assay, to calculate the percentage (%) of the substrate proteolysed during the 1 hour incubation period or to convert the measured rates of fluorescence increase into other useful units such as ng substrate proteolysed/min/ml enzyme.

15

20

The assay is used to calculate enzyme kinetic parameters such as Vmax and Km following standard principles described in *Fundamentals of Enzyme Kinetics* by Athel Cornish Bowden, 1979, published by Butterworths.

Using the SEP assay to determine the inhibition parameters of SEP inhibitors

25

To determine the IC₅₀ of SEP inhibitors (for example phosphoramidon), multiple SEP assays are performed as described above with a range of test concentrations of inhibitor included in the 50µl of DMSO solution (made by appropriate dilution of a 10mM 100% DMSO stock of inhibitor with 4% DMSO/50mM HEPES pH7.4.). Using a suitable standard graph fitting computer program, a sigmoidal dose response curve is fitted to a plot of log inhibitor concentration versus MaxV (or % inhibition or % activity). The IC₅₀ is calculated as the inhibitor concentration causing 50 % maximal inhibition. Typically

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

for a given IC_{50} determination, a dose range of at least 10 inhibitor concentrations differing in half log unit increments is used.

5 The SEP assay is used to determine the K_i and mode of inhibition (i.e. whether the inhibition is competitive, mixed, non-competitive, etc.) following standard enzymology principles as described, for example, in *Fundamentals of Enzyme Kinetics* by Athel Cornish-Bowden, 1979, published by Butterworths.

EXAMPLE 5 - AN ANIMAL MODEL OF SEXUAL AROUSAL

10

In our studies we have developed a robust reproducible model of the physiology of male and female sexual arousal. This model uses an anaesthetised rabbit and employs Laser Doppler technologies to monitor intracavernosal pressure and genital blood flow whilst routinely recording cardiovascular parameters. We are capable of measuring small changes in intracavernosal pressure within the penis and vaginal (and even clitoral) blood flow induced by pelvic nerve stimulation or infusion of VIP in the absence and presence of test agents.

20 We believe that our animal model directly reflects the clinical data. Hence, this model can be used to study candidate agents for the prophylaxis and/or treatment of MED and FSAD, such as measuring enhancement of penile erection via increases in intracavernosal pressure and enhancement vaginal or clitoral blood flow.

25 **Identifying VIP and other neuropeptides as potential substrates that are involved in male and female sexual arousal**

The ability of SEP to degrade the pro-sexual neuropeptide known as the vasoactive intestinal peptide (VIP) is measured by making use of, for example, a radioimmunoassay (RIA), such as the VIP RIA, that can be obtained commercially from Peninsula Laboratories, CA, USA.

30 A sample of SEP enzyme, typically 5-100 μ l of recombinant SEP (produced by the

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

method described above) is incubated with a sample of VIP peptide, typically 1-10ng for 5 hours at 37°C, in a buffer such as 50mM HEPES, pH7.4. A negative control identical to this but also containing 10 μ M phosphoramidon is set up and treated in an identical manner. After the incubation period, the quantity of VIP remaining in both the sample
 5 and the negative control is determined using the RIA as per manufacturer's instructions. The reduction in quantity of VIP in the sample relative to the negative control is a measure of the VIP proteolytic activity of SEP. The assay is used to determine enzyme kinetic parameters such as V_{max} and K_m following standard principles as described, for example, in *Fundamentals of Enzyme Kinetics* by Athel Cornish-Bowden, 1979,
 10 published by Butterworths.

EXAMPLE 6 - ANIMAL TEST METHODS FOR SEP INHIBITORS

Female sexual dysfunction animal model

15

Anaesthetic Protocol

Female New Zealand rabbits (~2.5kg) are pre-medicated with a combination of Medetomidine (Domitor®) 0.5ml/kg i.m., and Ketamine (Vetalar®) 0.25ml/kg i.m.
 20 whilst maintaining oxygen intake via a face mask. The rabbits are tracheotomised using a Portex™ uncuffed endotracheal tube 3 ID., connected to a ventilator and maintained at a ventilation rate of 30-40 breaths per minute, with an approximate tidal volume of 18-20 ml, and a maximum airway pressure of 10 cm H₂O. Anaesthesia is then switched to Isoflurane and ventilation continued with O₂ at 2 l/min. The right marginal ear vein is
 25 cannulated using a 23G or 24G catheter, and Lactated Ringer solution perfused at 0.5ml/min. The rabbit is maintained at 3% Isoflurane during invasive surgery, dropping to 2% for maintenance anaesthesia.

Cannulation of Vessels

30

The left groin area of the rabbit is shaved and a vertical incision is made approximately 5cm in length along the thigh. The femoral vein is exposed, isolated and then cannulated

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

with a PVC catheter (17G; Portex Limited, Hythe, Kent, UK) for the infusion of drugs and compounds. Cannulation is repeated for the femoral artery, inserting the catheter to a depth of 10cm to ensure that the catheter reaches the abdominal aorta. This arterial catheter is linked to a Gould system to record blood pressure. Samples for blood gas analysis are also taken via the arterial catheter. Systolic and diastolic pressures are measured, and the mean arterial pressure calculated using the formula [(diastolic x2 + systolic) ÷3]. Heart rate is measured via the pulse oxymeter and *Po-ne-mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc., OH, USA).

10

Stimulation of the Pelvic Nerve

A ventral midline incision is made into the abdominal cavity. The incision is about 5cm in length just above the pubis. The fat and muscle is bluntly dissected away to reveal the hypogastric nerve which runs down the body cavity. It is essential to keep close to the side curve of the pubis wall in order to avoid damaging the femoral vein and artery which lie above the pubis. The sciatic and pelvic nerves lie deeper and are located after further dissection on the dorsal side of the rabbit. Once the sciatic nerve is identified, the pelvic nerve is easily located. The term *pelvic nerve* is loosely applied; anatomy books on the subject fail to identify the nerves in sufficient detail. However, stimulation of the nerve causes an increase in vaginal and clitoral blood flow, and innervation of the pelvic region. The pelvic nerve is freed away from surrounding tissue and a Harvard bipolar stimulating electrode is placed around the nerve. The nerve is slightly lifted to give some tension, then the electrode is secured in position. Approximately 1ml of light paraffin oil is placed around the nerve and electrode. This acts as a protective lubricant to the nerve and prevents blood contamination of the electrode. The electrode is connected to a Grass S88 Stimulator. The pelvic nerve is stimulated using the following parameters: 5V, pulse width 0.5ms, duration of stimulus 10 seconds and a frequency range of 2 to 16Hz. Reproducible responses are obtained when the nerve is stimulated every 15-20 minutes.

20

A frequency response curve is determined at the start of each experiment in order to determine the optimum frequency to use as a sub-maximal response, normally 4Hz. The

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

compound(s) to be tested are infused, via the femoral vein, using a Harvard 22 infusion pump allowing a continuous 15 minute stimulation cycle.

Positioning of the Laser Doppler Probes

5

A ventral midline incision is made, at the caudal end of the pubis, to expose the pubic area. Connective tissue is removed to expose the tunica of the clitoris, ensuring that the wall is free from small blood vessels. The external vaginal wall is also exposed by removing any connective tissue. One Laser Doppler flow probe is inserted 3cm into the vagina, so that half the probe shaft is still visible. A second probe is positioned so that it lay just above the external clitoral wall. The position of these probes is then adjusted until a signal is obtained. A second probe is placed just above the surface of a blood vessel on the external vaginal wall. Both probes are clamped in position.

10

15 Vaginal and clitoral blood flow is recorded either as numbers directly from the Flowmeter using *Po-ne-mah* data acquisition software (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.), or indirectly from Gould chart recorder trace. Calibration is set at the beginning of the experiment (0-125ml/min/100g tissue).

20 *Infusion of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)*

The doses of VIP (Bachem, H-3775) infused are 2.0, 6.0, 20.0, 60.0 µg/kg i.v. and are infused in a volume of 0.5 ml of saline. VIP is infused using a Harvard 22 pump, infusing at 500µl/min via a 3-way tap into the femoral vein. After VIP infusion, the catheter is

25

flushed with heparinised saline (Hepsaline) so that no VIP is left in the catheter.

For experiments using VIP infusions, there is a need for an initial sensitising dose response curve (2-60µg/kg), in order that reproducible responses are obtained. An initial infusion of Hepsaline (50UI/ml) is infused to act as a negative control.

30

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Infusion of Inhibitors

SEP inhibitors and vehicle controls are infused at the same rate as VIP. SEP inhibitors are left for 30 minutes prior to a VIP dose response curve, and left for 15 minutes prior to pelvic nerve stimulation.

Data are expressed as mean genital (vagina/clitoris) blood flow $\pm$ standard error of the mean (s.e.m.). Significant changes are identified using Student's t-tests.

10 Male sexual dysfunction animal model*Anaesthetised Rabbit Methodology*

Male New Zealand rabbits (~2.5kg) are pre-medicated with a combination of Medetomidine (Domitor®) 0.5ml/kg i.m., and Ketamine (Vetalar®) 0.25ml/kg i.m. whilst maintaining oxygen intake via a face mask. The rabbits are tracheotomised using a Portex™ uncuffed endotracheal tube 3 ID., connected to a ventilator and maintained at a ventilation rate of 30-40 breaths per minute, with an approximate tidal volume of 18-20 ml, and a maximum airway pressure of 10 cm H₂O. Anaesthesia is then switched to Isoflurane and ventilation continued with O₂ at 2 l/min. The right marginal ear vein is cannulated using a 23G or 24G catheter, and Lactated Ringer solution perfused at 0.5ml/min. The rabbit is maintained at 3% Isoflurane during invasive surgery, dropping to 2% for maintenance anaesthesia.

25 Cannulation of Vessels

The left groin area of the rabbit is shaved and a vertical incision is made approximately 5cm in length along the thigh. The femoral vein is exposed, isolated and then cannulated with a PVC catheter (17G; Portex Limited) for the infusion of drugs and compounds. Alternatively, or in addition, the left jugular vein is exposed, isolated and then cannulated with a PVC catheter (17G; Portex Limited) for the infusion of drugs and compounds. Cannulation is repeated for the femoral artery, inserting the catheter to a depth of 10cm to

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

ensure that the catheter reaches the abdominal aorta. This arterial catheter is linked to a Gould system to record blood pressure. Samples for blood gas analysis are also taken via the arterial catheter. Systolic and diastolic pressures are measured, and the mean arterial pressure calculated using the formula $[(\text{diastolic} \times 2) + \text{systolic}] / 3$. Heart rate is measured via the pulse oxymeter and *Po-ne-nah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.).

Stimulation of the Pelvic Nerve

10 A ventral midline incision is made into the abdominal cavity. The incision is about 5cm in length just above the pubis. The fat and muscle is bluntly dissected away to reveal the hypogastric nerve which runs down the body cavity. It is essential to keep close to the side curve of the pubis wall in order to avoid damaging the femoral vein and artery which lie above the pubis. The sciatic and pelvic nerves lie deeper and are located after further
15 dissection on the dorsal side of the rabbit. Once the sciatic nerve is identified, the pelvic nerve is easily located. The term *pelvic nerve* is loosely applied; anatomy books on the subject fail to identify the nerves in sufficient detail. However, stimulation of the nerve causes an increase in intracavernosal pressure and cavernosal blood flow, and innervation of the pelvic region. The pelvic nerve is freed away from surrounding tissue and a
20 Harvard bipolar stimulating electrode is placed around the nerve. The nerve is slightly lifted to give some tension, then the electrode is secured in position. Approximately 1ml of light paraffin oil is placed around the nerve and electrode. This acts as a protective lubricant to the nerve and prevents blood contamination of the electrode. The electrode is connected to a Grass S88 Stimulator. The pelvic nerve is stimulated using the following
25 parameters: 5V, pulse width 0.5ms, duration of stimulus 20 seconds with a frequency of 16Hz. Reproducible responses are obtained when the nerve is stimulated every 15-20 minutes.

Several stimulations using the above parameters are performed to establish a mean control response. The compound(s) to be tested are infused, via the jugular vein, using a
30 Harvard 22 infusion pump allowing a continuous 15 minute stimulation cycle. The skin and connective tissue around the penis is removed to expose the penis. A catheter set

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

(Insyte-W, Becton-Dickinson 20 Gauge 1.1 x 48mm, Becton-Dickinson) is inserted through the tunica albuginea into the left corpus cavernosal space and the needle removed, leaving a flexible catheter. This catheter is linked via a pressure transducer (Ohmeda 5299-04) to a Gould system to record intracavernosal pressure. Once an intracavernosal pressure is established, the catheter is sealed in place using Vetbond (tissue adhesive, 3M). Heart rate is measured via the pulse oximeter and *Po-ne-mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.).

Intracavernosal blood flow is recorded either as numbers directly from the Flowmeter using *Po-ne-mah* data acquisition software (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems, Inc.), or indirectly from Gould chart recorder trace. Calibration is set at the beginning of the experiment (0-125ml/min/100g tissue).

Infusion of Inhibitors

The SEP inhibitor and vehicle controls are infused at a rate of 0.1ml/second. SEP inhibitors are left for 15 minutes prior to pelvic nerve stimulation.

Data are expressed as mean intracavernosal blood pressure $\pm$ s.e.m.. Significant changes are identified using Student's t-tests.

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

Claims

1. An isolated and/or purified polynucleotide comprising one or more of:
 - 5 (a) a polynucleotide encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2;
 - (b) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5;
 - (c) a polynucleotide encoding the polypeptide expressed by the DNA contained in NCIMB 41110;
 - 10 (d) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 83% identity to the polynucleotide of any one of (a) to (c);
 - (e) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is capable of hybridising to the polynucleotide of any one of (a) to (d);
 - (f) a complement to the polynucleotide of any one of (a) to (e); or
 - 15 (g) a polynucleotide fragment of the polynucleotide of any one of (a) to (f).
2. The polynucleotide of claim 1 which encodes human soluble secreted endopeptidase (human SEP).
- 20 3. A process for producing a polypeptide or fragment thereof comprising culturing a host cell transformed or transfected with a vector comprising the polynucleotide of claim 1 or claim 2 in culture medium under conditions sufficient for the expression of said polypeptide or fragment.
- 25 4. A polypeptide having SEP activity comprising one or more of:
 - (a) a polypeptide having the deduced amino acid sequence translated from the polynucleotide sequence in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof;
 - 30 (b) a polypeptide of SEQ ID NO: 2 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof;

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

- (c) a polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41110 and variants, fragments, homologues, analogues and derivatives thereof; or
 - (d) a polypeptide which has at least 78% identity to (i) the polypeptide encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5, (ii) the polypeptide of SEQ ID NO: 2, or (iii) the polypeptide encoded by the cDNA of NCIMB 41110.
- 5
5. An antibody against the polypeptide of claim 4.
- 10 6. A compound which inhibits or selectively inhibits the polypeptide of claim 4.
7. A pharmaceutical composition comprising the antibody of claim 5 or the compound of claim 6 and one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents or excipients.
- 15
8. The antibody of claim 5, the compound of claim 6, or the composition of claim 7 for use as a pharmaceutical.
9. Use of the antibody of claim 5 or the compound of claim 6, in the manufacture of a medicament for the prophylaxis and/or treatment of sexual dysfunction, in particular male erectile dysfunction (MED) or female sexual dysfunction (FSD).
- 20
10. Use according to claim 9, wherein said female sexual dysfunction (FSD) is female sexual arousal disorder (FSAD).
- 25
11. A method for the prophylaxis and/or treatment of sexual dysfunction, in particular male erectile dysfunction (MED) or female sexual dysfunction (FSD), in a patient comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the antibody of claim 5 or the compound of claim 6.
- 30
12. The method of claim 11, wherein said female sexual dysfunction (FSD) is female sexual arousal disorder (FSAD).

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

13. Cells genetically engineered *ex vivo* or *in vivo* to overexpress, underexpress or to exhibit targeted insertion or deletion of the polypeptide of claim 4.
- 5 14. Non-human animal comprising cells according to claim 13.
15. Cells deposited under Accession Number NCIMB 41110 and variants and mutants derivable therefrom capable of producing a polypeptide according to claim 4.

WO 02/06492

1/22

PCT/IB01/01263

Figure 1

Analysis of open reading frames (ORFs) of human SEP cDNA sequence

```

5      10      20      30      40      50      60
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      ggcaccagctcagccccaagccaactgcmctccatccagtcctggaaatccaccact
      G..T..S..S..A..P..S..S..C..S..P..I..P..V..P..G..R..P..P..T..
      A..P..A..Q..P..Q..A..T..A..L..P..S..Q..S..L..E..I..R..P..L..
10      H..Q..L..S..P..K..P..L..L..S..H..P..S..P..W..K..S..T..H..L..

      70      80      90      100     110     120
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      tggccagctcaccccaactccaccactgggaccagctccaggggcctgactgtgg
      W..P..S..S..P..Q..L..Q..P..T..G..T..Q..S..P..G..A..*..L..W..
15      G..P..A..H..P..N..S..N..P..L..G..P..S..L..Q..G..P..D..G..G..
      A..Q..L..T..P..T..P..T..H..W..D..P..V..S..R..S..L..T..V..G..

      130     140     150     160     170     180
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      gggccagcactcctgaglgagcaaggttccctccgggtgctctccgtccagagccct
      A..A..A..T..P..E..*..A..K..V..P..P..R..C..S..P..V..Q..S..P..
20      R..Q..F..L..L..S..E..Q..R..F..L..R..G..A..L..P..S..R..A..L..
      G..S..H..S..*..V..S..K..G..S..S..A..V..L..S..R..P..E..P..C..

25      190     200     210     220     230     240
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      gctgatggggaagtcgaaggcccttggggatgggtggagagcgctggccctgacgggga
      A..D..G..E..V..R..R..P..R..G..D..G..G..E..R..W..P..C..H..A..
30      L..M..G..K..S..E..G..P..V..G..M..V..B..S..A..G..R..A..G..Q..
      *..W..G..S..P..K..A..P..W..G..W..K..A..L..A..V..Q..G..R..

      250     260     270     280     290     300
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      gaagcgcgcggggttcctggaggggggactgctgctgctgctgctgctgctgacagctgc
      F..A..P..G..V..P..G..G..A..A..A..A..A..A..G..D..R..C..
35      K..R..P..G..F..L..E..G..E..L..L..L..L..L..L..V..T..A..A..
      S..A..R..G..S..W..R..G..S..C..C..C..C..C..C..W..*..P..L..P..

40

```

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

2/22

310 320 330 340 350 360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cctgggtggccttgggtgtcctctacgccgacccgcaggggaagcagctgccacgccttgc
P..G..L..G..C..P..L..R..P..Q..R..E..A..A..T..P..C..
5 L..V..A..L..G..V..L..Y..A..D..R..R..G..K..Q..L..P..R..L..A..
W..W..P..W..V..S..S..T..P..P..A..Z..G..S..S..C..H..A..L..L..
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
370 380 390 400 410 420
tagccggctgtccttctacggaggagaggaaccttgtaaaagaaaccccgaggat
10 *..P..A..V..L..L..T..G..G..E..D..L..C..K..Y..K..T..P..R..D..
S..R..L..C..P..L..Q..E..E..R..T..F..V..K..R..R..P..R..G..I..
A..C..C..A..S..Y..R..R..G..P..L..*..N..E..N..E..E..G..S..
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
430 440 450 460 470 480
cccgaggcccaagaggtgagcgaggtctgcacacccctggctggctgatagcagctgc
P..R..G..P..R..G..E..R..G..L..E..H..P..W..L..R..D..S..S..C..
P..E..A..Q..E..V..S..E..V..C..T..T..P..G..C..V..I..A..A..A..
20 Q..R..P..K..R..*..A..R..S..A..P..P..L..A..A..*..*..Q..L..P..
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
490 500 510 520 530 540
caggatcctccagaacatggacccgacacaggacccgtgtgacgacttctaccaglttgc
25 Q..D..P..P..E..H..G..P..D..H..G..T..V..*..R..L..D..P..V..C..
R..L..L..Q..W..M..D..P..T..T..R..P..C..D..D..F..Y..Q..F..A..
G..S..S..R..T..W..T..R..P..R..K..V..T..T..G..T..S..L..H..
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
550 560 570 580 590 600
atgaggaggctggctgcgggccacgtgatccctgagacccaactcaagatacagcatctt
30 M..R..R..D..A..A..A..P..R..D..P..*..D..Q..L..K..T..Q..H..L..
C..S..G..W..L..R..R..H..V..I..P..E..T..N..S..K..Y..S..I..F..
A..E..A..G..C..S..A..T..*..S..L..R..P..T..Q..D..D..T..A..S..L..
35|.....|.....|.....|.....|.....|
610 620 630 640 650 660
tgaactcctccgcagagctggaggtcatcctcaagcgggtgctggagaattcgactgc
40 *..R..P..P..R..H..A..G..G..H..P..Q..S..G..A..G..E..P..D..C..
D..V..L..R..D..E..J..N..V..T..L..K..A..V..L..B..N..S..T..A..
T..S..S..A..T..S..W..R..S..S..S..K..R..C..W..R..I..R..L..P..

WO 02/06492

PC/T/IB01/01263

3/22

670 680 690 700 710 720
|.....|.....|.....|.....|
 cnaggacccggccggcgtgtgggaaggccaggagctgtaccgctcctgcatgaaccagag
 5 Q..G..P..A..G..C..G..E..S..Q..B..A..V..P..L..J..H..E..P..E..
 K..D..R..P..A..V..E..K..A..R..T..L..Y..R..S..C..M..N..Q..S..
 R..T..G..R..Z..W..R..R..P..G..R..C..T..A..B..A..*..T..X..V..
 730 740 750 760 770 780
|.....|.....|.....|.....|
 10 tctgatagagaagcagggctctcagccctcgtggacatcttggaggtggtggggggtg
 C..D..R..E..A..R..L..S..A..P..A..H..H..G..G..G..G..R..L..
 V..I..E..K..R..G..S..Q..P..L..D..L..L..E..V..V..G..G..W..
R..S..E..A..L..S..P..C..W..T..S..W..R..W..E..A..G..
 790 800 810 820 830 840
|.....|.....|.....|.....|
 gccggtggcgtatggacaggtggaagcagacgttagactcagatgggagctggagcggca
 A..G..G..D..G..Q..V..B..R..D..R..R..T..R..V..G..A..E..A..A..
 P..V..A..M..D..R..N..E..T..V..G..L..E..W..E..L..E..R..Q..
 20 R..W..R..W..T..G..C..T..R..P..*..D..S..S..G..S..W..S..G..S..
 850 860 870 880 890 900
|.....|.....|.....|.....|
 gctggcgtgatgaactcaacttcaacaggcggcgtcctcatcgacctcttcactcggaa
 25 A..G..A..D..F..J..T..V..Q..Q..A..R..P..B..R..P..L..H..L..E..
 L..A..L..K..N..S..Q..F..N..R..R..V..L..I..D..L..F..I..W..N..
 W..R..*..*..T..H..S..S..T..G..A..S..S..S..T..S..S..S..G..T..
 910 920 930 940 950 960
|.....|.....|.....|.....|
 30 ccagcaccagaactccagccggcacatctctctcctagacccaccccttgggcctgcc
 R..R..P..B..L..Q..P..A..H..H..L..H..R..P..A..H..L..G..H..A..
 D..D..Q..N..S..S..R..H..I..I..Y..I..D..Q..P..T..L..G..M..E..
 T..T..R..T..D..A..G..T..S..S..T..*..T..S..E..P..W..A..C..P..
 35 970 980 990 1000 1010 1020
|.....|.....|.....|.....|
 ctcccgaagtagtacttcaacggcggcagcaacccggaaggtgcgggaagcctcctgca
 I..P..R..V..L..L..Q..R..R..Q..Q..P..E..S..A..G..S..J..P..A..
 40 S..R..E..Y..Y..Y..N..G..G..S..N..R..K..V..R..E..A..Y..L..Q..
 P..E..S..T..T..S..T..A..A..A..T..G..R..C..G..K..P..T..C..S..

WO 02/06492

4/22

PCT/IB01/01263

1030 1040 1050 1060 1070 1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gttcattggtgtcagtgccacgtttgtgcggggaggatgcaaacctgccagggaacagctg
5 V..E..G..V..S..G..H..V..A..A..G..G..C..R..P..A..Q..G..Q..L..
P..M..V..S..V..A..T..L..L..R..E..D..A..N..L..P..R..D..S..C..
S..W..C..Q..W..P..R..C..C..G..R..M..Q..T..C..P..G..T..A..A..
1090 1100 1110 1120 1130 1140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cctgggtgcaggaggacatgggtgagggtgtggagctggagacacagctggcaaggccac
10 P..G..A..G..G..H..G..A..G..A..G..A..G..D..T..A..G..Q..G..H..
L..V..Q..K..D..K..V..Q..V..E..E..L..R..T..Q..L..A..K..A..T..
W..C..R..R..T..W..C..R..C..W..S..W..R..H..S..W..P..R..P..R..
1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggtaacccacaggaggagagacagcctcctgccttgtacacacggatgggactggaggga
15 G..T..P..G..G..E..T..R..R..E..R..L..V..P..P..D..G..T..G..G..
V..P..Q..E..S..R..H..D..V..T..A..L..Y..H..R..M..G..L..E..E..
20 Y..F..R..R..R..D..T..T..S..S..P..C..T..T..G..W..D..W..R..S..
1210 1220 1230 1240 1250 1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gctgcaaaagccagtttggcctgaagggaatttaactggactctgtttacatacaaacctglgct
25 A..A..K..P..V..W..P..E..S..E..*..L..D..S..V..H..T..N..C..A..
H..Q..S..Q..F..G..L..K..G..F..N..W..Y..L..F..L..Q..T..V..L..
C..K..A..S..L..A..*..R..D..L..T..G..L..C..S..Y..K..J..C..Y..
1270 1280 1290 1300 1310 1320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atcctctgtcaaatcaagctgtgtgccagatgaggaagtggtggtctatggcatcccta
30 I..L..C..Q..M..Q..A..A..A..R..*..G..S..G..G..L..W..H..P..I..
S..S..V..K..I..K..L..L..P..D..E..E..V..V..Y..E..I..P..Y..
P..L..S..K..S..S..C..C..Q..M..R..K..W..S..M..A..S..P..T..
35 1330 1340 1350 1360 1370 1380
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cctgcagaacottggaacatcatcgacacctaactcagccaggaccatacagaactacat
40 P..A..E..P..*..K..H..H..R..H..L..L..S..Q..D..H..T..E..H..P..
L..Q..N..L..E..M..I..Y..D..T..Y..S..A..R..T..I..Q..M..Y..L..
C..R..T..L..K..T..S..S..T..P..T..Q..P..G..P..Y..S..T..T..W..

WO 02/06492

PC/T/IB01/01263

5/22

1390 1400 1410 1420 1430 1440
|.....|.....|.....|.....|.....|
 ggtotggcgcctgggtgtggacgcattggtatcctaagccagagattcaggacacacg
 G..L..A..P..G..A..G..P..H..W..*..P..K..P..E..T..Q..G..H..T..
 5 V..W..R..L..V..L..D..R..L..G..S..L..S..Q..R..F..K..D..T..R..
 S..G..A..W..C..W..T..A..L..V..A..*..A..R..D..S..R..T..H..E..
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
|.....|.....|.....|.....|.....|
 10 agtgaactacccgagggcgtgtttggcacaatgggtggaggggtgcgctggcgtgcatg
 S..E..L..P..Q..E..A..V..W..E..N..G..G..G..A..L..A..*..M..
 V..N..Y..R..K..A..L..F..G..T..K..V..E..E..V..R..W..S..R..C..
 *..T..T..A..R..R..C..L..A..Q..W..R..R..C..P..G..V..K..V..
 15 1510 1520 1530 1540 1550 1560
|.....|.....|.....|.....|.....|
 tctggggtacgtcacacgcacatggaggaucgcctgggctccctctatgctcaggaggc
 C..G..D..R..Q..Q..Q..H..G..E..R..R..G..L..P..D..R..Q..E..G..
 V..G..Y..V..N..S..N..M..E..N..A..V..G..S..L..Y..V..R..E..A..
 20 W..A..T..S..T..A..T..W..R..T..P..W..A..P..S..T..S..G..R..R..
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
|.....|.....|.....|.....|.....|
 gttccctggagacagcaagagcattggtcagagaactcattgacaagggtccggaacgtgtt
 25 V..P..W..R..Q..Q..E..H..G..Q..R..T..H..*..Q..G..A..D..S..V..
 F..P..G..D..S..K..S..M..V..R..E..E..I..D..K..V..R..T..V..F..
 S..L..E..T..A..R..A..W..S..E..H..S..D..T..R..C..G..Q..C..T..
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
|.....|.....|.....|.....|.....|
 30 tgtggagacgctggacgagctgggtcgtggtggacgaggagtcacagaagaaggccagga
 C..G..D..A..G..R..A..G..L..D..G..R..G..V..Q..E..E..G..A..G..
 V..E..T..L..D..E..L..G..M..D..E..S..K..K..A..Q..E..
 W..R..R..W..T..S..W..J..G..W..T..R..S..P..R..R..R..R..R..
 35 1690 1700 1710 1720 1730 1740
|.....|.....|.....|.....|.....|
 gaaggccatgagcatccgggcagatcgggcacccctgaactacatcccgagggatgaa
 40 E..G..H..E..E..P..G..A..D..R..A..P..*..L..H..P..G..D..E..
 K..A..M..S..I..R..E..Q..J..G..H..P..D..Y..L..E..S..M..N..
 R..P..*..A..G..S..R..S..G..T..J..T..T..S..W..R..R..S..T..

6/2.7

```

5
1950      1960      1970      1980      1990
|-----|-----|-----|-----|-----|
|caggcgngtgaagcaggagcctctccaatctgaactctcagaggacctgtactttgagaa|
Q. A. P. F. G. R. G. V. D. G. S. E. L. L. R. G. P. V. L. * . E.
R. R. L. D. E. E. Y. S. N. B. W. F. S. E. D. L. Y. F. E. N.
G. A. W. E. R. S. T. F. I. * . T. S. Q. R. T. C. T. L. R. T.

10
1810      1820      1830      1840      1850      1860
|-----|-----|-----|-----|-----|
|cagctctgcagaaacctcaaggctggggcgcccgaggagccctcagggaagcttcgggaanaaggt|
Q. S. A. E. P. Q. G. G. R. P. A. E. P. Q. D. A. S. G. K. G.
S. L. Q. R. D. K. V. S. A. Q. R. S. L. R. K. L. R. R. K. V.
V. C. R. T. T. S. R. A. P. S. G. A. S. S. G. F. S. K. * . R. W.

15
1870      1880      1890      1900      1910      1920
|-----|-----|-----|-----|-----|
|ggaccaccaattctcttgatcatcgtggggcggtgggttgaatgcttctantantocccaaaccg|
G. F. R. S. E. L. D. R. R. G. G. G. G. Q. C. V. L. L. P. K. F.
D. P. N. E. L. W. T. I. G. A. A. V. V. N. A. F. Y. S. E. N. R.
T. Q. I. S. G. S. S. G. R. R. W. S. H. R. S. Y. P. Q. T. E.

20
1930      1940      1950      1960      1970      1980
|-----|-----|-----|-----|-----|
|aaacccagatcttatctcctgcgggattcctctcagccccccttcttcagaaaggagcagcc|
K. P. D. C. T. P. C. R. D. P. P. A. P. A. P. E. L. Q. Q. G. A. A.
N. Q. T. V. P. P. A. G. L. D. P. P. P. P. S. S. K. E. Q. P.
T. R. D. Y. S. L. P. G. B. S. S. E. P. P. S. S. A. R. S. S. H.

30
1990      2000      2010      2020      2030      2040
|-----|-----|-----|-----|-----|
|acaggccttgaacttttgaggatgggatgggatcgggcacgagatcacgcacggctt|
T. G. L. E. L. W. R. H. W. D. G. D. R. A. R. D. B. A. R. L.
Q. A. T. N. F. G. G. I. G. M. V. I. G. H. E. I. T. H. G. F.
R. P. * . T. L. E. A. G. G. W. * . S. G. T. R. S. R. I. A. L.

35
2050      2060      2070      2080      2090      2100
|-----|-----|-----|-----|-----|
|tgacgcacatggcggaacttcgcacagaatgggcacagatggatgggtgagtgactt|
* . A. Q. W. P. E. L. R. Q. E. W. Q. H. D. G. L. V. E. * . L.
D. D. N. G. S. N. F. D. K. N. G. N. M. M. D. W. W. S. N. F.
T. T. M. A. G. T. S. T. R. M. A. T. * . W. I. G. G. V. T. S.

```

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

7/22

2110 2120 2130 2140 2150 2160
|.....|.....|.....|.....|.....|
 ctccaccagcactccgggagcagtcacagtgcatgatctaccagtagcggaactactc
 5 U..E..P..A..L..P..G..A..V..R..V..E..D..J..P..V..R..Q..L..L..
 S..T..Q..H..F..R..E..Q..S..E..C..K..I..Y..Q..Y..G..N..Y..S..
 P..F..S..T..S..G..S..S..Q..S..A..*..S..T..S..T..A..T..T..P..
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
|.....|.....|.....|.....|.....|
 ctgggacctggcagacggaacgagtgacggattccaccccttgggganacattgc
 10 L..G..F..G..R..R..T..E..R..F..R..Q..H..P..W..G..K..D..C..
 W..D..L..A..D..E..Q..N..V..N..G..F..N..T..L..G..E..N..I..A..
 G..T..W..Q..C..N..R..T..*..T..D..S..T..P..L..G..K..T..L..L..
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
|.....|.....|.....|.....|.....|
 tgacaacggaggggtgcggcaagctataaggcctacatcaagtggatggcaggggtgg
 15 *..Q..R..R..G..A..A..S..L..*..G..L..P..Q..V..D..G..R..G..W..
 D..N..G..C..V..R..Q..A..Y..K..A..Y..I..K..W..M..A..R..G..G..
 20 T..T..E..G..C..G..K..F..I..R..P..T..S..S..G..W..Q..R..V..A..
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
|.....|.....|.....|.....|.....|
 caaggacacagcagctgcacggcctggatctnaccatgagcagctcttcttctcaacta
 25 Q..G..P..A..A..A..R..P..G..S..B..P..*..A..A..L..D..H..Q..L..
 K..D..Q..Q..L..P..G..L..D..L..T..H..S..Q..L..F..F..I..N..Y..
 R..T..S..S..C..P..A..W..I..S..F..K..S..S..S..S..S..S..T..N..
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
|.....|.....|.....|.....|.....|
 tgcccagggtgtgggtgcggctccacggcccgagttggcatccaatccatcaagacgga
 30 C..P..G..V..V..R..V..L..P..A..R..V..R..E..P..I..E..Q..D..R..
 A..Q..V..W..C..G..S..Y..R..P..E..F..A..I..Q..S..I..K..T..D..
 P..R..C..G..A..G..P..T..G..P..S..P..S..N..D..S..R..Q..T..
 35 2410 2420 2430 2440 2450 2460
|.....|.....|.....|.....|.....|
 cgtccacagtcacctgaagtacagggtaactgggggtcgctgcagaaacctggcgccttcgc
 40 R..P..Q..S..P..E..V..Q..G..T..G..V..A..R..E..P..G..R..L..R..
 V..H..S..P..L..K..Y..R..V..J..G..S..L..Q..N..D..A..A..F..A..
 S..P..V..P..*..S..T..G..Y..W..G..R..C..R..T..W..P..P..S..Q..

WO 02/06492

PCT/IB01/01263

8/22

2470 2480 2490 2500 2510 2520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
agacacgttccactgtgcccggggcccccacccatgcaccccaaggagcgatgncgggtgtg
5 R..B..V..P..L..C..P..G..H..F..H..A..P..O..G..A..M..P..R..V..
D..T..F..H..C..A..R..G..T..F..M..H..P..K..E..R..C..R..V..W..
T..R..S..T..V..P..G..A..P..P..C..T..P..R..S..D..A..A..C..C..
2530 2540 2550 2560 2570 2580
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
10 gtagccaaaggccctgcgcgcgtgcgggcacacgcacactgctgctggagggaactctgt
V..A..K..A..L..P..R..C..A..A..H..A..H..L..L..G..G..I..C..
*..P..R..P..C..R..A..V..R..P..T..P..T..C..C..S..E..A..S..V..
S..Q..G..P..A..A..L..C..G..P..R..P..P..A..A..R..R..H..L..C..
2590 2600 2610 2620 2630 2640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
15 gggaagggtgcagctcaggggcacccagtgtaactgcacccgggcaacccatgccaagcc
A..K..V..Q..L..A..A..T..Q..C..T..S..R..P..G..Q..P..C..Q..A..
R..R..C..S..*..R..R..P..S..V..R..P..A..P..A..N..B..A..K..P..
20 E..G..A..A..S..G..D..P..V..Y..V..P..P..R..P..T..M..P..S..L..
2650 2660 2670 2680 2690 2700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
25 tgcctgcacaggccctcgcgcctggccctagggtgcagccacnctgcctgacacccaggga
C..L..P..G..L..C..A..H..P..R..V..Q..P..P..A..*..H..P..G..M..
A..C..Q..A..S..A..P..G..L..G..C..S..H..L..P..D..T..Q..G..*..
P..A..R..P..L..R..L..A..*..G..A..A..T..C..L..T..P..R..D..E..
2710 2720 2730 2740 2750 2760
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
30 agcagtgctccagtcagtcactggccggagcccccctccacgcaccccgagggtcag
S..S..V..Q..C..S..T..W..T..G..A..P..S..T..D..T..B..G..A..Q..
A..V..S..S..A..V..P..G..P..E..P..P..P..Q..T..P..A..G..L..S..
Q..C..P..V..Q..Y..L..D..R..S..P..H..H..R..H..P..R..G..S..V..
35 2770 2780 2790 2800 2810 2820
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
40 tgcacccgtcacagctctgttagagcaatccactgtgtcctgcacacccctccagggtgca
C..P..R..H..S..S..V..E..T..I..X..C..V..L..P..T..L..Q..G..A..
A..P..V..T..A..L..*..R..Q..S..T..V..S..C..P..P..S..K..V..H..
P..P..S..Q..L..C..R..D..N..Q..L..C..P..A..H..P..P..R..C..I..

WO 02/06492

9/22

PC/T/IB01/01263

283028402850286028702880

.....|.....|.....|.....|.....|.....|

ttgtcttcagtatctacagcttcagacttgagctaaagtaatgcttcaagaaaaaa

5L..S..S..I..Y..S..F..R..L..E..L..S..X..C..P..K..E..K..K..

C..L..P..V..S..T..A..S..D..T..S..*..V..N..A..S..K..K..K..K..

V..P..Q..Y..J..Q..L..Q..T..*..A..K..*..M..L..Q..R..K..K..K..

289029002910292029302940

.....|.....|.....|.....|.....|.....|

10aaaaaaaaa

K..K..K..K..

K..K..K..K..

K..K..K..

15

WO 02/06492

10/22

PCT/IB01/01263

Figure 2

5 Comparison of human SEP to most closely related human proteins by pairwise alignment
from the blastp algorithm

10

Swiss-Prot Protein name	Whole protein	Catalytic domain
SEP_HUMAN	100% (779/779)	100% (209/209)
NEP_HUMAN	54% (382/696)	66% (139/209)
ECB1_HUMAN	39% (281/707)	54% (113/209)
ECE2_HUMAN	39% (298/757)	52% (109/209)
PEX_HUMAN	39% (284/723)	50% (108/214)
XCE_HUMAN	36% (257/710)	48% (101/209)
KELL_HUMAN	27% (189/700)	36% (77/209)

WO 02/06492

11/22

PCT/IB01/01263

Figure 3

5 Comparison of human, rat and mouse sequences for SBP by pairwise alignment from
 blastp (protein) and fasta (coding nucleotide) algorithms

10

Species	Protein (%identity)	Coding nucleotide (%identity)
Human	100% (779/779)	100% (2337 overlap)
Mouse	77% (690/770)	82% (2082 overlap)
Rat	77% (607/780)	82% (2109 overlap)

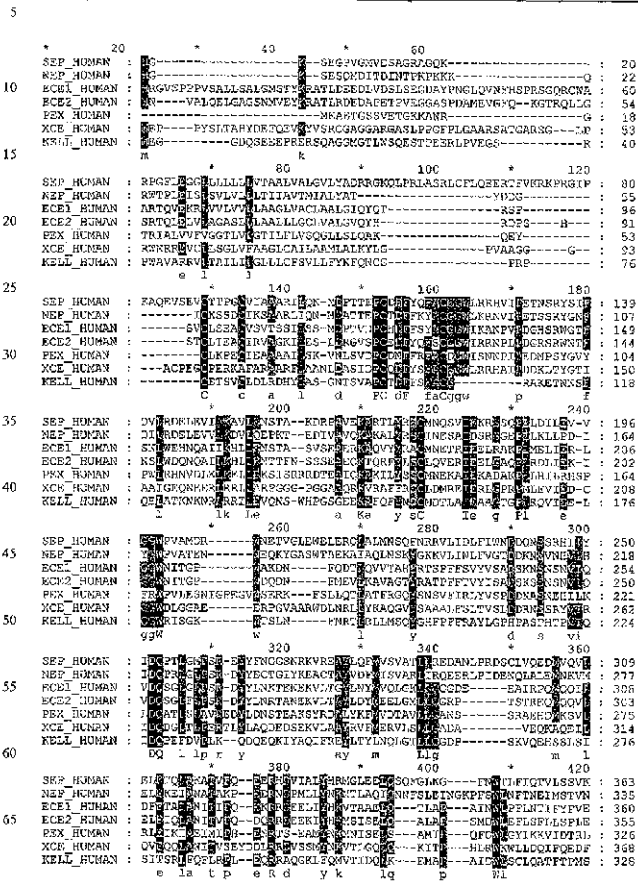
WO 02/06492

12/22

PCT/IB01/01263

Figure 4

Multiple alignment of human SEP and related human proteins showing catalytic domain



WO 02/06492

PCT/IB01/01263

13/22

```

      *          440          *          460          *          480
SEP_HUMAN : IKLL---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 516
NEP_HUMAN : ISLT---NEQD---YAMF---TKIKITLTRYSA---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 539
ECE1_HUMAN : IT---SSG---SYOMY---EQYSLINTTSC---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 511
ECE2_HUMAN : LS---SSG---SYOMY---EQYSLINTTSC---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 511
PEX_HUMAN : YPHLKQISPSD---SRVPCFKMLFRILGSEK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 511
XCE_HUMAN : SE---SSG---SYOMY---EQYSLINTTSC---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 511
KELL_HUMAN : LS---SSG---SYOMY---EQYSLINTTSC---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 511

      *          500          *          520          *          540
SEP_HUMAN : DCRVNYKRLS---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 471
NEP_HUMAN : ESRNATFRALY---TSETA---DNR---YVNGHKN---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 443
ECE1_HUMAN : DAEKFMVNY---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 467
ECE2_HUMAN : SAQELILELY---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 462
PEX_HUMAN : YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 438
XCE_HUMAN : EILAEIAGW---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 473
KELL_HUMAN : EARRKLEKLE---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 442

      *          560          *          580          *          600
SEP_HUMAN : ICKVTPVVERD---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 530
NEP_HUMAN : IACKVTPVVERD---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 501
ECE1_HUMAN : IACKVTPVVERD---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 524
ECE2_HUMAN : IACKVTPVVERD---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 513
PEX_HUMAN : IACKVTPVVERD---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 496
XCE_HUMAN : IACKVTPVVERD---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 523
KELL_HUMAN : IACKVTPVVERD---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 499

      *          620          *          640          *          660
SEP_HUMAN : FSDLEFS---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 590
NEP_HUMAN : YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 561
ECE1_HUMAN : YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 584
ECE2_HUMAN : YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 579
PEX_HUMAN : YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 556
XCE_HUMAN : YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 589
KELL_HUMAN : YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 558

      *          680          *          700          *          720
SEP_HUMAN : PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 649
NEP_HUMAN : PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 620
ECE1_HUMAN : PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 643
ECE2_HUMAN : PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 638
PEX_HUMAN : PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 616
XCE_HUMAN : PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 640
KELL_HUMAN : PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK---EGLMASHPTMDIVSSGRTYK : 609

      *          740          *          760          *          780
SEP_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 766
NEP_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 737
ECE1_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 757
ECE2_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 752
PEX_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 735
XCE_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 762
KELL_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 719

      *          800          *          820          *          840
SEP_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 766
NEP_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 737
ECE1_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 757
ECE2_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 752
PEX_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 735
XCE_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 762
KELL_HUMAN : GYVY---YVWLEFSVIG---YVKKV---PDE---YGIY---ONLNIIDYYSAR---TIGLVLVLELDRISSGSRK : 719

```

70

WO 02/06492

14/22

PCT/IB01/01263

SEP_HUMAN : GTEPGRER-SSU : 779
NEP_HUMAN : NEPGRGR-SSU : 750
ECE1_HUMAN : GCEGRGR-SSU : 773
5 ECE2_HUMAN : GCEGRGR-SSU : 765
PEX_HUMAN : NEPGRGR-SSU : 749
XCE_HUMAN : VPEGRGR-SSU : 775
KEGL_HUMAN : GALGRGR-SSU : 732
a tmp C VR
10 --catalytic--

WO 02/06492

15/22

PCT/IB01/01263

Figure 5

5 Multiple alignment of human, rat and mouse SEP proteins showing catalytic domain

```

*      20      40      60
SEP_HUMAN : GSKSGPTLSESSSRACVZKCFDSCILHLITAPRLGLVLAADRSKQLESDA : 59
SEP_RAT   : GSKSSSTLSESSSRACVZKCFDSCILHLITAPRLGLVLAADRSKQLESDA : 58
SEP_MOUSE : GSKSSSTLSESSSRACVZKCFDSCILHLITAPRLGLVLAADRSKQLESDA : 58
          mgkks vgsrkag CG KPSVE GLVLL LLA GAVLGVY 36KQFLD
          *      80      100      120
SEP_HUMAN : SELLGDSKRSSTPKFSTPEAQVSVCTTGVIRAAAILLMLITPEPDSFVDF : 119
SEP_RAT   : SELLGDSKRSSTPKFSTPEAQVSVCTTGVIRAAAILLMLITPEPDSFVDF : 115
SEP_MOUSE : SELLGDSKRSSTPKFSTPEAQVSVCTTGVIRAAAILLMLITPEPDSFVDF : 105
          GIDHS EAVVVR LR ass KSGITTFSCVIAAKRIQHMDqs ECDITQYR
          *      140      160      180
SEP_HUMAN : CGGVLRAVTPATHSYSLPLDGLLEVILKGLVLSKAKEFAVEKATLYPSCKNQ : 179
SEP_RAT   : CGGVLRAVTPATHSYSLPLDGLLEVILKGLVLSKAKEFAVEKATLYPSCKNQ : 175
SEP_MOUSE : CGGVLRAVTPATHSYSLPLDGLLEVILKGLVLSKAKEFAVEKATLYPSCKNQ : 165
          CGGVLRAVTPATHSYSLPLDGLLEVILKGLVLSKAKEFAVEKATLYPSCKNQ
          200      220      240
SEP_HUMAN : VIEKASDLDILNAGGNFVAGGSDHNEHLELEELQLAKSQFNRRVLIPIK : 239
SEP_RAT   : VIEKASDLDILNAGGNFVAGGSDHNEHLELEELQLAKSQFNRRVLIPIK : 235
SEP_MOUSE : VIEKASDLDILNAGGNFVAGGSDHNEHLELEELQLAKSQFNRRVLIPIK : 225
          VIEKASDLDILNAGGNFVAGGSDHNEHLELEELQLAKSQFNRRVLIPIK
          260      280      300
SEP_HUMAN : DDGSSSPHVIDCFILCHSEETVNCNRRRERVYKQKASRQDRAV : 299
SEP_RAT   : DDGSSSPHVIDCFILCHSEETVNCNRRRERVYKQKASRQDRAV : 294
SEP_MOUSE : DDGSSSPHVIDCFILCHSEETVNCNRRRERVYKQKASRQDRAV : 285
          DDGSSSPHVIDCFILCHSEETVNCNRRRERVYKQKASRQDRAV
          320      340      360
SEP_HUMAN : KNGFPAVLESLGLRAVVDSEHDLGVHNSNPKSGQFUKKFMNLTFCQV : 359
SEP_RAT   : KNGFPAVLESLGLRAVVDSEHDLGVHNSNPKSGQFUKKFMNLTFCQV : 354
SEP_MOUSE : KNGFPAVLESLGLRAVVDSEHDLGVHNSNPKSGQFUKKFMNLTFCQV : 345
          KNGFPAVLESLGLRAVVDSEHDLGVHNSNPKSGQFUKKFMNLTFCQV
          380      400      420
SEP_HUMAN : ESKNTGDFEEVYVGTITLNLN---DYKASLNMVLSRVLDRESSLQSKPT : 419
SEP_RAT   : ESKNTGDFEEVYVGTITLNLN---DYKASLNMVLSRVLDRESSLQSKPT : 414
SEP_MOUSE : ESKNTGDFEEVYVGTITLNLN---DYKASLNMVLSRVLDRESSLQSKPT : 405
          ESKNTGDFEEVYVGTITLNLN---DYKASLNMVLSRVLDRESSLQSKPT
          440      460      480
SEP_HUMAN : KAVKALSSSEFVAGKSCFVNGWCAVGSVVRSLPQSKMVAELVDSV : 479
SEP_RAT   : KAVKALSSSEFVAGKSCFVNGWCAVGSVVRSLPQSKMVAELVDSV : 474
SEP_MOUSE : KAVKALSSSEFVAGKSCFVNGWCAVGSVVRSLPQSKMVAELVDSV : 465
          KAVKALSSSEFVAGKSCFVNGWCAVGSVVRSLPQSKMVAELVDSV
          500      520      540
SEP_HUMAN : VMLDGLVMDCEKPAQKPKSSREGIDEDVLEPNRCEKFSNIFSELLYFN : 539
SEP_RAT   : VMLDGLVMDCEKPAQKPKSSREGIDEDVLEPNRCEKFSNIFSELLYFN : 534
SEP_MOUSE : VMLDGLVMDCEKPAQKPKSSREGIDEDVLEPNRCEKFSNIFSELLYFN : 525
          VMLDGLVMDCEKPAQKPKSSREGIDEDVLEPNRCEKFSNIFSELLYFN
          560      580      600
SEP_HUMAN : SLGNVGLKSLRFRKVLNLWIGAFVNAFSPNKGIVFAGILQPPFFSKDQ : 599
SEP_RAT   : SLGNVGLKSLRFRKVLNLWIGAFVNAFSPNKGIVFAGILQPPFFSKDQ : 594
SEP_MOUSE : SLGNVGLKSLRFRKVLNLWIGAFVNAFSPNKGIVFAGILQPPFFSKDQ : 585
          SLGNVGLKSLRFRKVLNLWIGAFVNAFSPNKGIVFAGILQPPFFSKDQ
          620      640      660
SEP_HUMAN : CLNFGGIGVIGHEITMGFDNGRNYAHNMFWNSNFIQTEPDSKMIYQVDF : 659
SEP_RAT   : CLNFGGIGVIGHEITMGFDNGRNYAHNMFWNSNFIQTEPDSKMIYQVDF : 654
SEP_MOUSE : CLNFGGIGVIGHEITMGFDNGRNYAHNMFWNSNFIQTEPDSKMIYQVDF : 645
          CLNFGGIGVIGHEITMGFDNGRNYAHNMFWNSNFIQTEPDSKMIYQVDF
          =====catalytic domain=====
          =====catalytic domain=====

```

WO 02/06492

16/22

PCT/IB01/01263

```

      *               680      *               700      *               720
SEP_HUMAN : KDLAEEKNVNGENPLGENTIAKCGVRQAYKATLQKMAEGSDCCDFPSLCCHBOLEFNN : 719
SEP_RAT   : KDLAEEKNVNGEPLGENTIAKCGVRQAYKATLQKMAEGSDCCDFPSLCCHBOLEFNN : 714
SEP_MOUSE : KDLAEEKNVNGEPLGENTIAKCGVRQAYKATLQKMAEGSDCCDFPSLCCHBOLEFNN : 705
5  =====catalytic domain=====
      *               740      *               760      *               780
SEP_HUMAN : KQVWCGSYDPEFAGSIRKTOVESLKYR/LGSQHLGCGLEPCPSGSPNRRKCKL : 779
SEP_RAT   : KQVWCGSYDPEFAGSIRKTOVESLKYR/LGSQHLGCGLEPCPSGSPNRRKCKL : 774
SEP_MOUSE : KQVWCGSYDPEFAGSIRKTOVESLKYR/LGSQHLGCGLEPCPSGSPNRRKCKL : 765
10 =====catalytic domain=====
```

5 Multiple alignment of human, rat and mouse SEP coding sequence showing catalytic domain

[illegible]

PCIT/IR01/01263

[illegible]

PCIT/IB01/01263

[illegible]

PC/T/IB01/01263

[illegible]

WO 02/06492

21/22

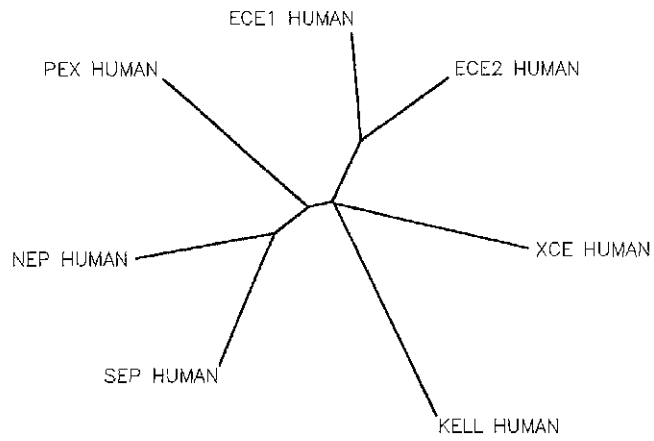
PCT/IB01/01263

Figure 7

5

Phylogenetic analysis by Neighbour-Joining Distance method expressed as a radial tree
derived from multiple alignment of whole SEP-like proteins

10



WO 02/06492

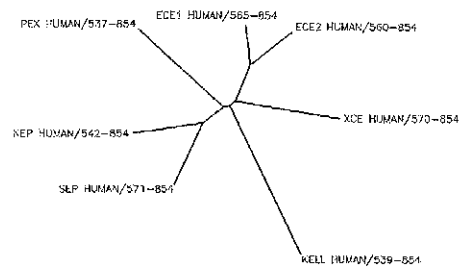
22/22

PCT/IB01/01263

Figure 8

5

Phylogenetic analysis by Neighbour-Joining Distance method expressed as a radial tree derived from the catalytic domain region of the multiple alignment



PCIT/IB01/01263

1

(which forms part of the description)

SEO ID NO: 1

5

Nucleotide sequence (cDNA) coding for human SEP

[illegible]

WO 02/06492

2

PCT/IB01/01263

SEQ ID NO: 2

Human SEP protein predicted from translation of cDNA sequence in +1 open reading5 frame

10 HKSSEGPVGVHVESAGRAGQKRFGFLSGGLLALLLVTAALVALGVLYADRRGKQLPCLAS
RLCTLQEDRTFVKRKPRGIPEAQSVSVCTTFCGVIAARILQNYDPTTEPCDDVYQFAC
GGWLRARHVEPTNSRYSTFDVLRDELEVILKAVLENSTAKDRPAVEKARTLYRSCWNSQV
LEKSGSQPLDIIENVVGGWFVAMDENNETVGLERELERQLALMNSQFNRRVLIIDUTWNO
DQNSRRHIIYIDPTIGMPSEYFYFNGGSMRKVREAYLQFMYSVAILLRCDANLPRDSCL
15 VQEDNQQVLELATQAASTVFPQERHIDVIALYHRAGLSELSQSCFELNGFNWTLFTQPVLS
SVKIKLLPDEEVVYGIPIILQNLNLTDTYSARTIQNVLVRLVLRIGSELSCFEKRTV
NYRKALFGTHVEEVRRKSCVGYVNGWKEANVGLYVRALFPQDSKSNVRELTKVRTVTV
ETLDLGRMDSESKKKAKQKAKSIREQICHFDYILEENNRRIQSYSNLNFSEDLVFENS
LQNLKVGARSLRKLREKVDPMNLIGAAVVNAFYSPNRRNQTIVTFAGILQDETFSEKQVQ
20 ALNFGGIGMVGEEYTHGFDCNRHFDKNGMMHDKWSNFTQHTFEQSECMYQYGNYSW
DLADFPQVNGFNTLGENTADNGGVRQAYKAYLKWMALGGKQQPGLDLTHEQLFFNYA
QVWGGSYRPRFAIQSKCKDVHSEPLKYRVLSLQNLAAKADTFRCARGTPMHPSEKRCVW

25

SEQ ID NO: 3

Primer

30 CTGCTTGAATGGATTGGATG

SEQ ID NO: 4

35

Primer

GCCCTTGGCAGTCGAAATCTCC

40

PCIT/IB01/01263

3

5 Nucleotide sequence (cDNA) coding for human SEP - including 5' and 3' partial vector sequences (highlighted)

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PC, / IB 01/01263
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/57 C12N9/64 C07K14/47 C07K16/40 A61K38/55 A61K39/395 C12N6/10 C12N1/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 777 291 A (INST NAT SANTE RECH MED) 15 October 1998 (1999-10-15) page 1, line 29,30 page 2, line 26,27 page 3, line 12 - line 23 page 4, line 14,15 page 6, line 9,10 page 8, line 4 - line 19 --- -/-	1-8, 13-15
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document, but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see 4.2.2.2) "O" document relating to an oral disclosure, new exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document: member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 November 2001		20/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5858, D-69115 Heidelberg Tel. (+31-72) 340-2040, Fax: 31 651 804 01 E-mail: isa@epo.nl		Authorized officer Chavanne, F

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 01/01263

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
X	KOJI IKEDA ET AL: "Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, VOL. 274, NR. 45, PAGE(S) 32469-32477 XP002140284 ISSN: 0021-9258 abstract page 32470, column 2, paragraphs 3,4 figure 1 figure 3	1-8, 13-15
X	GHADDAR G ET AL: "MOLECULAR CLONING AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A NEW MOUSE TESTIS SOLUBLE-ZINC-METALLOPEPTIDASE OF THE NEPRILYSIN FAMILY", BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, VOL. 347, PAGE(S) 419-429 XP000920818 ISSN: 0264-6021 abstract page 426, column 1, paragraph 2 figure 2	1-8, 13-15

Form PCT/IS6210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/AB 01 /01263

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 6 (completely), 7-12 (partially)

Present claim 6 relates to an extremely large number of possible compounds. In fact, there is no technical characterisation of the claimed compound. Moreover, the claim encompasses so many different compounds that a lack of clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and concise, namely antibodies specifically binding to the polypeptide of claim 4.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

Internal Application No
PL 17 IB 01/01263

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2777291	A	15-10-1999	FR 2777291 A1	15-10-1999
			EP 1068336 A2	17-01-2001
			WO 9953077 A1	21-10-1999

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 P 1/12	A 6 1 P 1/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 1/12	
A 6 1 P 5/40	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 5/40	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/10	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 15/10	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 27/06	
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
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	
C 1 2 N 9/99	C 1 2 N 9/99	
	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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,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,PL,PT,RO,RU,S D,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100092886

弁理士 村上 清

(72)発明者 ハロー、イアン・デニス

イギリス国ケント シーティー１３・９エヌジェイ、サンドウィッチ、ラムズゲート・ロード、ファイザー・グローバル・リサーチ・アンド・ディベロプメント

(72)発明者 スタイシー、ピーター

イギリス国ケント シーティー１３・９エヌジェイ、サンドウィッチ、ラムズゲート・ロード、ファイザー・グローバル・リサーチ・アンド・ディベロプメント

(72)発明者 ウォルシュ、ロデリック・トーマス

イギリス国ケント シーティー１３・９エヌジェイ、サンドウィッチ、ラムズゲート・ロード、ファイザー・グローバル・リサーチ・アンド・ディベロプメント

(72)発明者 ウエイマン、クリストファー・ピーター

イギリス国ケント シーティー１３・９エヌジェイ、サンドウィッチ、ラムズゲート・ロード、ファイザー・グローバル・リサーチ・アンド・ディベロプメント

(72)発明者 フィリップス、スティーヴン・チャールズ

イギリス国ケント シーティー１３・９エヌジェイ、サンドウィッチ、ラムズゲート・ロード、ファイザー・グローバル・リサーチ・アンド・ディベロプメント

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA14 CA04 CA12 DA02 DA06 EA04 GA13 HA01

4B050 CC04 DD11 LL01 LL03
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA33 CA44 CA46
4C084 MA02 NA14 ZA06 ZA08 ZA15 ZA16 ZA33 ZA36 ZA38 ZA40
ZA42 ZA59 ZA66 ZA68 ZA70 ZA73 ZA81 ZB11 ZB27 ZB35
ZC03
4C085 AA13 AA14
4H045 AA10 AA11 AA30 CA40 DA75 DA89 EA20 EA50 FA74