

(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2004-503220

(P2004-503220A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
A 0 1 K 67/027
A 6 1 K 38/00
A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 3/04

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 0 1 K 67/027
A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 3/10

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
4 B O 6 3
4 B O 6 4
4 B O 6 5
4 C O 8 4

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 204 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-504645 (P2002-504645)
(86) (22) 出願日 平成12年11月28日 (2000.11.28)
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月20日 (2002.12.20)
(86) 国際出願番号 PCT/US2000/032479
(87) 国際公開番号 W02001/098497
(87) 国際公開日 平成13年12月27日 (2001.12.27)
(31) 優先権主張番号 09/599,087
(32) 優先日 平成12年6月21日 (2000.6.21)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 09/724,000
(32) 優先日 平成12年11月28日 (2000.11.28)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500203709
アムジェン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
20, サウザンド オークス, ワン
アムジェン センター ドライブ
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者
ボルベリノ, アンソニー ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
60, サウザンド オークス, マリエ
ッタ サークル 2850

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分泌型結腸上皮間質性-1 ポリペプチド、これをコードする核酸、およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、新規な分泌型結腸上皮間質性-1 (Secreted Epithelial Colon Stromal-1) (Secs-1) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、Secs-1 ポリペプチドを産生するための選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法を提供する。本発明はさらに、Secs-1 ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の診断、処置、改善、および/または予防のための薬学的組成物および方法を提供する。

```

1                               50
rat Secs-1      MRLTLGSLF ENLFLLCLVL SSGGRKPAK F...PKLRK CHLSPKSKFI
murine Secs-1  MRLCALSLI, CMILLCFQIF SSGGRKPAK S...LKLRR CHLSPKSKFI
human Secs-1   MRLVLSSLL CYLLLCFSIF STGRKRPAPK AWSRRKRLC CRRVSPKST

51                               81
rat Secs-1      TWKGNHTREK RPKR.KLRN SSVVIGALPQ I
murine Secs-1  TWKGNHTREK RLCRNKLPK SSVVIGALPQ I
human Secs-1   NLKSHIVRLC KPEKLEPEPR LSVVIGALPQ V

```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号 1 または配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；
 - (b) A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 および P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサートのヌクレオチド配列；
 - (c) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 - (d) (a) ~ (c) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
 - (e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

10

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70 % 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
 - (b) 配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 および P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；
 - (c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 および P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサート、(a)、または (b) の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2 もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、ヌクレオチド配列の領域；
 - (d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 および P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサート、または (a) ~ (c) いずれかの領域；
 - (e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに
 - (f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

20

30

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、以下：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2 または配列番号 5 のい

40

50

れかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む (a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (f) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a) ~ (e) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 4】

請求項 1、請求項 2 または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 6】

真核生物細胞である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

原核生物細胞である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

Secs-1 ポリペプチドを産生するプロセスであって、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で請求項 5 に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

【請求項 10】

請求項 8 に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、前記 Secs-1 ポリペプチドをコードする DNA に作動可能に連結された、ネイティブな Secs-1 ポリペプチドに対するプロモーター DNA 以外のプロモーター DNA を含む、プロセス。

【請求項 11】

請求項 2 に記載の単離された核酸分子であって、ここで、同一性パーセントは、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、および Smith-Waterman アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

【請求項 12】

化合物が Secs-1 ポリペプチド活性または Secs-1 ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項 5、請求項 6、または請求項 7 のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞における Secs-1 ポリペプチド活性または Secs-1 ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【請求項 13】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC 受託番号 PTA-1753 および PTA-1755 中の DNA インサートによってコードされるアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 14】

単離されたポリペプチドであって、以下：

10

20

30

40

50

(a) 配列番号 3 または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70 % 同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号 2 もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 および P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサートによってコードされるアミノ酸配列、または (a) ~ (c) のいずれかの、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

10

【請求項 15】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

20

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

30

【請求項 16】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、同一性パーセントは、G A P、B L A S T P、F A S T A、B L A S T A、B L A S T X、B e s t F i t、および S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

40

【請求項 18】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 19】

配列番号 2 もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項 18 に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。

50

【請求項 20】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 21】

ヒト化抗体である、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 22】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 23】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 24】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 25】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 26】

C D R 接続抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 27】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 28】

可変領域フラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 29】

F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 28 に記載の可変領域フラグメント。

【請求項 30】

配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 31】

検出可能標識に結合される、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 32】

S e c s - 1 ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 33】

S e c s - 1 ポリペプチド関連の疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項 18 に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 34】

配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項 35】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載のポリペプチドに結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 36】

請求項 18 に記載の抗 S e c s - 1 抗体またはフラグメントを用いて、S e c s - 1 ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

【請求項 37】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 38】

10

20

30

40

50

前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 40】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項 41】

水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項 40 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 42】

請求項 41 に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリマー（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項 43】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 44】

20

前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 45】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項 46】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項 47】

前記異種アミノ酸配列が、IgG 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 46 に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項 48】

医学的状态を処置、予防、または改善するための方法であって、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 49】

処置、予防または改善される前記医学的状态が、造血障害、骨粗しょう症、大理石骨病、骨形成不全症、ページェット病、歯周病、高カルシウム血症、急性糸球体腎炎、慢性糸球体腎炎、癌、糖尿病、肥満、または悪液質である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

40

被験体において病的状態または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：
（a）サンプル中の、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの、発現の存在または発現量を決定する工程；および

（b）該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。

【請求項 51】

デバイスであって、以下：

50

(a) 移植に適した膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のタンパク質を分泌する、細胞；

を備え、

該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項 52】

Secs-1 ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該 Secs-1 ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項 53】

前記化合物に結合した場合に、前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

動物においてポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 55】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項 56】

化合物が Secs-1 ポリペプチド活性または Secs-1 ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項 55 に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝露する工程、および該哺乳動物における Secs-1 ポリペプチド活性または Secs-1 ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、新規な分泌型結腸上皮間質性-1 (Secreted Epithelial Colon Stromal-1 (Secs-1)) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、Secs-1 ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、Secs-1 ポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および／または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療薬の発見を大いに加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノムの一部および全体への重複配列の組み立てならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および／または構造の目印に対する相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤として使用される生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0003】

過去 10 年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に対する可能性は、未だ大部分理解されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド (

これらは、治療分子に対して「標的」としてはたらき得る）は、未だ同定されていない。

【0004】

従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0005】

(発明の要旨)

本発明は、新規 S e c s - 1 の核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0006】

本発明は、以下：

- (a) 配列番号 1 または配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列； 10
 - (b) A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 または P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサートのヌクレオチド配列；
 - (c) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 - (d) (a) ~ (c) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
 - (e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0007】

本発明はまた、以下：

- (a) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70 % 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
 - (b) 配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 もしくは P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；
 - (c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 もしくは P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサート、(a)、または (b) の領域であって、ここで、このポリペプチドフラグメントは、配列番号 2 もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、ヌクレオチド配列の領域； 30
 - (d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 もしくは P T A - 1 7 5 5 中の D N A インサート、または (a) ~ (c) のいずれかの領域；
 - (e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに
 - (f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、 40
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0008】

本発明はさらに、以下：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活 50

性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列； 10

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)～(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。 20

【0009】

本発明は、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号PTA-1753またはPTA-1755中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0010】

本発明はまた、以下：

(a) 配列番号3または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、必要に応じてアミノ末端メチオンをさらに含む、アミノ酸配列； 30

(b) 配列番号2または配列番号5のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このフラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列、ATCC受託番号PTA-1753およびPTA-1755中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、もしくは(a)～(c)のいずれかの、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、 40

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0011】

本発明は、さらに、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番 50

号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

10

【0012】

Secs-1アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【0013】

本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびSecs-1ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【0014】

Secs-1ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた、本発明に含まれる。Secs-1核酸分子は、Secs-1ポリペプチドの発現およびSecs-1ポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、Secs-1核酸分子は、内因性Secs-1ポリペプチドの発現を妨害する様式で動物に導入される（すなわち、Secs-1ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

20

【0015】

本発明のSecs-1ポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

30

【0016】

本発明のSecs-1ポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニスト性であってもアンタゴニスト性であってもよい。

【0017】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは選択的結合因子ならびに1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物もまた、本発明によって含まれる。薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

40

【0018】

本発明のSecs-1ポリペプチドおよびSecs-1核酸分子は、疾患および障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を処置、予防、改善、および／または検出するために使用され得る。

【0019】

本発明はまた、Secs-1ポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、Secs-1ポリペプチドを試験分子と接触させて、この試験分子のこのポリペプチドに対する結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、Secs-1ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、Secs-

50

c s - 1 ポリペプチドの発現または S e c s - 1 ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0020】

S e c s - 1 ポリペプチドの発現を調節する方法および S e c s - 1 ポリペプチドのレベルを調節する（すなわち、増加または減少させる）方法もまた、本発明によって含まれる。1つの方法は、S e c s - 1 ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、S e c s - 1 ポリペプチドの発現を調節または調整するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

10

【0021】

本発明の別の局面において、S e c s - 1 ポリペプチドは、そのレセプター（「S e c s - 1 ポリペプチドレセプター」）を同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローン化するために広範囲に使用されている。例えば、S i m o n s e n および L o d i s h、1994、T r e n d s P h a r m a c o l . S c i . 15:437-41ならびに T a r t a g l i a ら、1995、C e l l 83:1263-71を参照のこと。S e c s - 1 ポリペプチドレセプターの単離は、S e c s - 1 ポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性 S e c s - 1 ポリペプチドレセプター、抗 S e c s - 1 ポリペプチドレセプター選択的結合因子（例えば、抗体またはその誘導体）、低分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれもが、1つ以上の疾患または障害（本明細書中に開示されるものを含む）の処置に使用され得る。

20

【0022】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、体系的な目的のみのためであり、そして、そこに記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される

（定義）

用語「S e c s - 1 遺伝子」または「S e c s - 1 核酸分子」あるいは「S e c s - 1 ポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるようなヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるようなポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 1 7 5 3 または P T A - 1 7 5 5 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列、または本明細書中で定義されるような核酸分子を含むか、あるいはこれらからなる核酸分子をいう。

30

【0023】

用語「S e c s - 1 ポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替的形態のうちの1つをいう。

【0024】

用語「S e c s - 1 ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるような S e c s - 1 ポリペプチドのアミノ酸配列の R N A 転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常は R N A ）をいう。

40

【0025】

用語「単離された核酸分子」とは、（1）総核酸が供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、（2）「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、（3）天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、あ

50

るいは(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として、天然には存在しない本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、天然に結合される少なくとも1つの混入核酸分子を実質的に含まない。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、その天然の環境において見出される任意の他の夾雑核酸分子または他の夾雑物(これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0026】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNA配列またはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシー-N 10
6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン(pseudocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N 6
-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N 6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン(β -D-mannosyl 20
queosine)、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N 6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン(oxybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2, 6-ジアミノプリン。

【0027】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を伝達するために使用される任意の分子(例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス)をいうために使用される。用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換使用に適切であり、そして挿入された異種核酸配列の発現 30
を、指示および/または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング(イントロンが存在する場合)のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0028】

用語「作動可能に連結された」は、隣接配列の配置をいうために本明細書中で、使用され、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成または構築される。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および/または翻訳に影響を及ぼし得る。例えば、コード配列は、プロモーターがコード配列の転写を指示し得る場合に、このプロモーターに作動可能に連結される。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と隣接する必要はない。従って、例えば 40
、介在する非翻訳性であるが転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

【0029】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいうために使用される。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

【0030】

用語「Secs-1ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミ 50

ノ酸配列を含むポリペプチド、および関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、Secs-1ポリペプチドフラグメント、Secs-1ポリペプチドオルソログ、Secs-1ポリペプチド改変体、およびSecs-1ポリペプチド誘導体が挙げられ、これは、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する。Secs-1ポリペプチドは、本明細書中で定義されるような成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

【0031】

用語「Secs-1ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるようなポリペプチドの、アミノ末端（リーダー配列を有するかもしれない）での短縮および／またはカルボキシル末端での短縮を含むポリペプチドをいう。用語「Secs-1ポリペプチドフラグメント」はまた、Secs-1ポリペプチドオルソログ、Secs-1ポリペプチド誘導体、もしくはSecs-1ポリペプチド改変体の、アミノ末端での短縮および／またはカルボキシル末端での短縮をいうか、またはSecs-1ポリペプチド対立遺伝子改変体もしくはSecs-1ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端での短縮および／またはカルボキシル末端での短縮をいう。Secs-1ポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。Secs-1ポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮および／または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約30アミノ酸、または約40アミノ酸、または約50アミノ酸、または約60アミノ酸、または約70アミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸または約200アミノ酸を含む。このようなSecs-1ポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、Secs-1ポリペプチドに対する抗体を作製するために使用され得ることが理解される。

【0032】

用語「Secs-1ポリペプチドオルソログ」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるようなSecs-1ポリペプチドのアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのSecs-1ポリペプチドは、互いにオルソログであると考えられる。

【0033】

用語「Secs-1ポリペプチド改変体」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるSecs-1ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および／またはSecs-1ポリペプチドフラグメント）、ならびに／または付加（例えば、内部付加および／またはSecs-1融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むSecs-1ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在（例えば、Secs-1ポリペプチド対立遺伝子改変体、Secs-1ポリペプチドオルソログ、およびSecs-1ポリペプチドスプライス改変体）し得るか、あるいは、人工的に構築され得る。このようなSecs-1ポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるようなDNA配列からそれに応じて変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1～3、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～30、または1～40、または1～50、または50より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および／または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはそのいずれかの組み合わせであり得る。

【0034】

用語「Secs-1ポリペプチド誘導体」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに

示されるようなポリペプチド、本明細書中で定義されるような、S e c s - 1 ポリペプチドフラグメント、S e c s - 1 ポリペプチドオルソログ、またはS e c s - 1 ポリペプチド改変体をいい、これらは、化学的に改変されている。用語「S e c s - 1 ポリペプチド誘導体」はまた、本明細書中で定義されるような、S e c s - 1 ポリペプチド対立遺伝子改変体またはS e c s - 1 ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいい、これらは、化学的に改変されている。

【0035】

用語「成熟S e c s - 1 ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したS e c s - 1 ポリペプチドをいう。成熟S e c s - 1 ポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシ末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N結合型および／またはO結合型グリコシル化など）を含み得る。例示的な成熟S e c s - 1 ポリペプチドは、配列番号3および配列番号6のアミノ酸配列によって示される。

10

【0036】

用語「S e c s - 1 融合ポリペプチド」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるようなポリペプチド、本明細書中で定義されるような、S e c s - 1 ポリペプチドフラグメント、S e c s - 1 ポリペプチドオルソログ、S e c s - 1 ポリペプチド改変体、またはS e c s - 1 誘導体のアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミノ酸の融合（例えば、異種ペプチドまたはポリペプチド）をいう。用語「S e c s - 1 融合ポリペプチド」はまた、本明細書中で定義されるような、S e c s - 1 ポリペプチド対立遺伝子改変体またはS e c s - 1 ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミノ酸の融合をいう。

20

【0037】

用語「生物学的に活性なS e c s - 1 ポリペプチド」は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むS e c s - 1 ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を有するS e c s - 1 ポリペプチドをいう。さらに、S e c s - 1 ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、S e c s - 1 ポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0038】

用語「単離されたポリペプチド」とは、（1）細胞供給源から単離される場合に、天然と一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から分離されている本発明のポリペプチド、（2）「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）連結しない、本発明のポリペプチド、（3）天然には連結しないポリペプチドに（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）作動可能に連結される、本発明のポリペプチド、あるいは（4）天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、その天然の環境において見出される少なくとも1つの混入ポリペプチドまたは他の混入物を実質的に含まない。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、その天然の環境において見出される任意の他の夾雑ポリペプチドまたは他の夾雑物（これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）を実質的に含まない。

30

40

【0039】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2つ以上のヌクレオチド配列または2つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるように、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のうちのより小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって位置づけられたギャップアラインメント（存在する場合）との間の、同一の一致のパーセントを評価する。

【0040】

50

用語「類似性」は、「同一性」とは同類の概念であるが、対照的に「類似性」は、同一の一致および保存的置換の一致の両方を含む関係の測定をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換が存在する位置がさらに5つ存在する場合、同一性パーセントは50%のままであるが、類似性パーセントは75% (15/20) である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間の類似性の程度は、これらの2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

【0041】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成されている物質をいう。

10

【0042】

用語「有効量」および「治療有効量」は、本明細書中に示されるようなSecs-1ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるSecs-1ポリペプチドまたはSecs-1核酸分子の量をいう。

【0043】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのSecs-1ポリペプチド、Secs-1核酸分子、またはSecs-1選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方材料をいう。

20

【0044】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

【0045】

用語「選択的結合因子」とは、Secs-1ポリペプチドに特異性を有する分子をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子が、ヒトSecs-1ポリペプチドに結合し、かつヒト非Secs-1ポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間のバージョン（例えば、マウスポリペプチドおよびラットポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

30

【0046】

用語「形質導入」とは、通常はファージによる1つの細菌から別の細菌への遺伝子の伝達をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達をいう。

【0047】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来DNAまたは外因性DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら, 1973 *Virology* 52:456; Sambrookら, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); およびChuraら, 1981, *Gene* 13:197を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

40

50

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、形質転換DNAは、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソードエレメントとして一過的に保持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。

【0049】

10

(核酸分子および／またはポリペプチドの関連性)

関連した核酸分子が、配列番号1または配列番号4のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含むこと、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかにおけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような関連したSecs-1ポリペプチドは、例えば、1以上のN-連結もしくはO-連結グリコシル化部位の付加および／もしくは欠失、または1以上のシステイン残基の付加および／もしくは欠失を含み得る。

【0050】

20

関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかのSecs-1ポリペプチドの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または少なくとも約30個のアミノ酸、または約40個のアミノ酸、または約50個のアミノ酸、または約60個のアミノ酸、または約70個のアミノ酸、または70個より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、Secs-1核酸分子のフラグメントを包含する。

【0051】

さらに、関連したSecs-1核酸分子はまた、本明細書中で定義したとおりの中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのSecs-1核酸分子またはポリペプチドをコードする分子の十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を包含し、このポリペプチドは、配列番号2もしくは配列番号5、または本明細書中に定義したとおりの核酸フラグメント、または本明細書中に定義したとおりのポリペプチドをコードする核酸フラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。ハイブリダイゼーションプロブは、本明細書中に提供されるSecs-1配列を用いてcDNAライブラリー、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーを関連した配列についてスクリーニングするために調製され得る。Secs-1ポリペプチドのDNA配列および／またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるとおりの配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプロブを設計し得る。

30

【0052】

40

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは42℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989);

50

Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0053】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響される。他の薬剤は、非特異的および／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、 NaDodSO_4 、(SDS) 10、ficol1、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH 6.8～7.4で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHからほぼ独立する。Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0054】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって評価され得る：

$$T_m (\text{℃}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (G + C\%) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、G+C%は、ハイブリッド中での（グアニン+シトシン）塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1℃下げられる。 30

【0055】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは37～50℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015Mナトリウムイオン中での50℃という「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を可能にする。

【0056】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さのDNAの融解温度は、約71℃である。65℃で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、約6%の不一致が可能になる。より関連性の遠い配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。 40

【0057】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1M NaCl^* 中での融解温度の良好な評価は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{塩基対あたり } 2 \text{℃} + G - C \text{塩基対あたり } 4 \text{℃}$$

* 6×塩クエン酸ナトリウム (SSC) 中でのナトリウムイオン濃度は、1Mである。S 50

uggsら, Developmental Biology Using Purified Genes 683 (BrownおよびFox編, 1981)を参照のこと。

【0058】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、 $6 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドの T_m よりも $0^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 低い温度においてである。

【0059】

別の実施形態では、関連した核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示すとおりのポリペプチドに対して少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示されるとおりのポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

【0060】

核酸配列における相違は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および／または非保存的改変をもたらし得る。

【0061】

配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する、対応する改変）は、Secs-1ポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生じる。対照的に、Secs-1ポリペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実質的な改変は、以下を維持することに対するその影響が顕著に異なる、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得る：(a)例えば、シートコンホメーションもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、(b)標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさ。

【0062】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、非ネイティブ残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンで置換され得る。

【0063】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0064】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；

10

20

30

40

50

- 4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；
 5) 鎖の配向に影響を与える残基：G l y、P r o；および
 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0065】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーに対する交換を包含し得る。このような置換された残基は、非ヒト S e c s - 1 ポリペプチドと相同なヒト S e c s - 1 ポリペプチドの領域またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

【0066】

このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性特性および電荷特性に基づいて、ヒドロパシー指数を割り当てられている。ヒドロパシー指数は、以下である：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン／シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)。

【0067】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、ヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている (K y t e ら、1982, J. M o l. B i o l. 157:105-31)。特定のアミノ酸が、類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸に代えて置換され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ヒドロパシー指数に基づいて変化を起こす際に、ヒドロパシー指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものが、なおより特に好ましい。

【0068】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る (特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合) こともまた、当該分野において理解されている。タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される場合に、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【0069】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0±1)；グルタミン酸 (+3.0±1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5±1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；およびトリプトファン (-3.4)。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープをまた、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」と呼ばれる。

【0070】

所望のアミノ酸置換 (保存的であれ非保存的であれ) は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、S e c s - 1 ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載される S e c s - 1 ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表 I に記載

10

20

30

40

50

される。

【 0 0 7 1 】

【 表 1 】

表 1

アミノ酸置換

もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ 酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示される通りのポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、Secs-1 ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、Secs-1分子の領域における変化が、Secs-1ポリペプチドの生物学的活性および／または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが、理解される。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持しながら天然に存在する残基に代わって置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0072】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造－機能研究を再調査し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するSecs-1ポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、Secs-1ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似のアミノ酸置換を、選択し得る。

【0073】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、当業者は、Secs-1ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基を含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または適切でない活性を生じたことを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせるかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0074】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 422-27; Chouら、1974, Biochemistry 13: 222-45; Chouら、1974, Biochemistry 113: 211-22; Chouら、1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45-48; Chouら、1978, Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276; およびChouら、1979, Biophys. J. 26: 367-84を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する、2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長は、二次構造(ポリペプチドまたはタンパク質の構造における可能な折り畳みの数を含む)の増強された予測性を提供してきた。Holmら、1999, Nucleic Acids Res. 27: 244-47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、臨界数の構造が解明されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた(Brennerら、1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369-76)。

【0075】

二次構造を推定するさらなる方法としては、「スレッディング(threading)」

10

20

30

40

50

(Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-87; Sipplら、1996, Structure 4:15-19)、「プロフィール分析」(Bowieら、1991, Science, 253:164-70; Grubbskovら、1990, Methods Enzymol. 183:146-59; Grubbskovら、1987, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 84:4355-58)、および「進化学的連鎖」(Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)が挙げられる。

【0076】

好ましいSecs-1ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および／または型が、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、Secs-1ポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合型糖鎖を除去する。1つ以上のN連結グリコシル化部位(代表的に、天然に存在するグリコシル化部位)が排除され、そして1つ以上の新たなN結合部位が作製される、N結合型糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいSecs-1改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、Secs-1ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体構造へとリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0077】

他の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有しかつポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこの配列からなるか、あるいは少なくとも1つのアミノ酸欠失を有しかつポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、ポリペプチドがカルボキシル末端および／またはアミノ末端の短縮を有しかつさらにこのポリペプチドが、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、含むかまたはこの配列からなる。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を含み、そしてここで、ポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、含むかまたはこの配列からなる。

【0078】

さらに、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のSecs-1ポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合してホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合してヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：Secs-1融合ポリペプチドの検出および／または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レ

10

20

30

40

50

セプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは別の S e c s - 1 ポリペプチドとは異なる治療活性を有する、ポリペプチド。

【0079】

融合は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他の S e c s - 1 ポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約20～約50アミノ酸残基である。DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有するリンカーまたはアダプター分子がまた、設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【0080】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他の S e c s - 1 ポリペプチドは、ヒト I g G の F c 領域の1つ以上のドメインに融合する。抗体は、以下の機能的に独立した2つの部分を含む；抗原を結合する「F a b」として公知の可変ドメイン、ならびに相補的活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に關与する、「F c」として公知の定常ドメイン。F c は、長い血清半減期を有し、一方で F a b は、短寿命である。C a p o n ら、1989, *Nature* 337: 525-31。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、F c ドメインは、より長い半減期を提供し得るか、または F c レセプター結合、プロテインA結合、補体結合、および恐らく、胎盤移入のような機能を組み込み得る。同書。表 I I は、当該分野において公知の特定の F c 融合物の使用を要約する。

【0081】

【表2】

表 II
治療用 Fc 融合物の Fc 融合物

Fc 形態	融合パートナー	治療関連	参考文献
IgG1	CD30-シロニン末端	ホジキン病; 赤血球リンパ腫; 下咽頭癌;白血病	米国特許第 5,480,881号
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症性; 骨髄腫抑制	Zheng et al., 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher et al., 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee et al., 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, 抗原 IgE (最初アミノ酸) (続く)	TNF レセプター	炎症; 免疫抑制	米国特許第 5,808,027号
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon et al., 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2 の N 末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill et al., 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPG の C 末端	変形性関節症; 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レゾルチンの N 末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, 1997年 12月4日出願
ヒト IgG1	CTLA-4	免疫抑制	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

一例において、ヒト I g G のヒンジ領域、C H 2 領域、および C H 3 領域は、当業者に公知の方法を使用して、S e c s - 1 ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合し得る。別の例において、ヒト I g G のヒンジ領域、C H 2 領域、および C H 3 領域は、S e c s - 1 ポリペプチドフラグメント（例えば、S e c s - 1 ポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおい

て、融合し得る。

【0082】

得られる Secs-1 融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化／多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような特定の品質を改善するよう変更され得る

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算される。このような方法としては、Computational Molecular Biology (A. M. Lesk編、Oxford University Press 1988) ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D. W. Smith編、Academic Press 1993) ; Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A. M. GriffinおよびH. G. Griffin編、Humana Press 1994) ; G. von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987) ; Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux編、M. Stockton Press 1991) ; ならびにCarilloら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を与えるために、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための、好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ (GAP (Devereuxら、1984, Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-10) を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (Altschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD) ; Altschulら、1990、前出) から公共に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【0084】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択された整列方法 (GAPプログラム) は、特許請求されるポリペプチドの少なくとも50の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0085】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、配列同一性の百分率が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合 (アルゴリズムによって決定される「適合したスパン」) のために、整列される。ギャップオープニングペナルティー (gap opening penalty) (これは、平均対角の3倍として計算される: 「平均対角」とは、使用される比較行列 (comparison matrix) の対角の平均である; 「対角」とは

、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である）およびギャップエクステンションペナルティー（gap extension penalty）（これは通常、ギャップオープニングペナルティーの0.1倍である）、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される（Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure（補遺3 1978）（PAM250比較行列）；Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19（BLOSUM 62比較行列）を参照のこと）。

【0086】

10

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53；

Comparison matrix: BLOSUM 62（Henikoffら、前出）；

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較（末端ギャップに対してはペナルティーがないこととともに）のためのデフォルトパラメータである。

20

【0087】

核酸分子配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 前出；

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

このGAPプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0088】

30

Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む、他の例示的なalgorithm、gap opening penalty、gap extension penalty、comparison matrix、およびthreshold of similarityが使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較（例えば、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA）；ならびにさらに、その比較が所定の対の配列間（この場合には、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）であるか、1つの配列と大きなデータベースの配列との間（この場合には、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるかに依存する。

40

【0089】

（核酸分子）

Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式（化学合成、cDNAもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および／またはcDNAのPCR増幅が挙げられるが、これらに限定されない）で容易に得られ得る。

【0090】

本明細書中において使用される組換えDNA法は、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）および／

50

またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Green Publishers Inc. およびWiley and Sons 1994)に記載されている方法である。本発明は、本明細書中に記載されるような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0091】

Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が1つの種から同定された場合には、この遺伝子の全てまたは一部を、同じ種由来のオーソログまたは関連する遺伝子を同定するためのプローブとして使用し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、Secs-1ポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のcDNAをスクリーニングし得る。さらに、配列番号1または配列番号4のいずれかに記載されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて、このスクリーニングから得られる誤った陽性の数を最小にする。

10

【0092】

Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子もまた、発現されたタンパク質の特性に基づいて陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

20

【0093】

以下に記載される説明に従い実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現させ得る。例えば、Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望されるヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたSecs-1ポリペプチドが、多量に生成され得る。

30

【0094】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。この方法において、cDNAは、酵素逆転写酵素を使用して、ポリ(A)+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には、Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別個の領域に対して相補的である）が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのcDNAに添加され、そしてこのポリメラーゼが、これら2つのプライマー間のcDNA領域を増幅する。

【0095】

Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989, Angew. Chem. Intl. 第28版: 716-34によって記載されるような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、Secs-1遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATG（これは、メチオニン残基をコードする）を有する。このメチオニンは、宿主細胞において産生されるポリペプチドが

40

50

その細胞から分泌されるよう設計されているか否かに依存して、Secs-1ポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0096】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるSecs-1ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択される宿主細胞およびSecs-1ポリペプチドに依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子において使用されるのに好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先度（codon preference）についての「Eco_high.Cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0（Genetics Computer Group, Madison, WI）によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod.」が挙げられる。

【0097】

いくつかの場合において、Secs-1ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望され得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る（変異誘発技術の説明に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと）。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0098】

（ベクターおよび宿主細胞）

Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である）。Secs-1ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および／または真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、Secs-1ポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および／またはホスホリル化）されるか否かに一部依存する。その場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説については、Meth. Enz., 第185巻（D. V. Goeddel編, Academic Press 1990）を参照のこと。

【0099】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列ならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」という）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタープライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0100】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、Secs-1ポリペプチド

コード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子)を含み得; このオリゴヌクレオチド配列は、ポリHis(例えば、ヘキサHis)、または別の「タグ」(例えば、FLAG、HA(赤血球凝集素インフルエンザウイルス)またはmyc(これに対して、市販の抗体が存在する))をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、Secs-1ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとして、タグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、引き続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような、種々の手段によって、精製されたSecs-1ポリペプチドから除去され得る。

10

【0101】

隣接配列は、同種(すなわち、宿主細胞と同じ種および/または株由来)であり得るか、異種(すなわち、宿主細胞種または株以外の種由来)であり得るか、ハイブリッド(すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ)であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、Secs-1ポリペプチド発現を調節するために通常機能するネイティブな配列であり得る。従って、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、または任意の植物であり得るが、但し、隣接配列は、この宿主細胞の機構において機能的であり、そしてこの宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0102】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、Secs-1遺伝子の隣接配列以外の、本発明で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

20

【0103】

隣接配列の全てまたは一部のみが既知である場合、これは、PCRを使用して、ならびに/あるいは適切なオリゴヌクレオチドおよび/または同種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知ではない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子さえも含み得る大きなDNA片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen(登録商標)カラムクロマトグラフィー(Chatsworth, CA)、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

30

【0104】

複製起点は、代表的に、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅を補助する。特定のコピー数までのベクターの増幅は、いくつかの場合において、Secs-1ポリペプチドの最適な発現のために重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、複製起点は、既知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322(New England Biolabs, Beverly, MA)からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起源(例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス)は、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない(例えば、SV40起源は、それが初期プロモーターを含むという理由のみによって、しばしば使用されている)。

40

50

【0105】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の3'末端に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメントと、それに続くポリT配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化されるか、またはさらにベクターの一部としての市販されているが、これはまた、本明細書中に記載された核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0106】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるか；(b) 細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは、(c) 複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

10

【0107】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のために大いに要求されている遺伝子が、組換え細胞の継続世代の染色体内でタンデムに反復されているプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞の形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが固有に、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように適応される。培地中の選択因子の濃度を連続的に変化させ、それによって選択遺伝子と Secs-1 ポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって、選択圧を加える。結果として、増加した量の Secs-1 ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

20

【0108】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そして Shine-Dalgarno 配列（原核生物）または Kozak 配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現される Secs-1 ポリペプチドのプロモーターに対して3'側およびコード配列に対して5'側に配置される。Shine-Dalgarno 配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン（すなわち、高いA-G含有量を有する）である。多くの Shine-Dalgarno 配列は、同定されており、これらのそれぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、容易に合成され得、原核生物ベクターにおいて使用され得る。

30

【0109】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞の外に Secs-1 ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、Secs-1 核酸分子のコード領域に位置するか、または直接 Secs-1 ポリペプチドコード領域の5'側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能的である任意のシグナル配列が、Secs-1 核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、Secs-1 核酸分子に対して同種（天然に存在する）または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大半の場合、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からの Secs-1 ポリペプチドの分泌は、分泌された Secs-1 ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入された Secs-1 核酸分子の一部であり得る。

40

【0110】

Secs-1 ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブな Secs-1 ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、または、Secs-1 ポリペプチドコー

50

ド領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用は本発明の範囲内である。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブな *Secs-1* ポリペプチドシグナル配列を認識せず、そしてプロセスもしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシン *II* リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、ネイティブな *Secs-1* ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、 α 因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列で十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

10

【0111】

真核生物宿主細胞発現系においてグリコシル化が所望されるような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列 (*presence*) が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列 (*pro-sequence*) を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、1 位に（成熟タンパク質の最初のアミノ酸と相対的に）、発現に付随する 1 つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全には除去されない可能性がある。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される 1 つまたは 2 つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合に所望の *Secs-1* ポリペプチドのわずかに短縮された (*truncate*) 形態を生じ得る。

20

【0112】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の 1 つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合に特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合に *Secs-1* 遺伝子内に天然に存在するものであり得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない場合（大部分の *cDNA* について）、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列および *Secs-1* 遺伝子に対してイントロンの位置は、イントロンが有効に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、*Secs-1 cDNA* 分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位に対して 3' 側であり、かつポリ-A 転写終止配列に対して 5' 側である。好ましくは、イントロン（単数または複数）は、コード配列を妨害しないように、*cDNA* の 1 つの側または他の側（すなわち、5' 側または 3' 側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまたここに含まれる。必要に応じて、1 つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

30

【0113】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、*Secs-1* ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約 100 ~ 1000 bp）の開始コドンに対して上流（すなわち、5' 側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、従来、2 つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）のうちの 1 つにグループ化されている。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養素の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答して、それらの制御下で *DNA* からの転写の増加したレベルを開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対してほとんど制御しないかまたは全く制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源の *DNA* からプロモータ

40

50

ーを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、Secs-1ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなSecs-1プロモーター配列は、Secs-1核酸分子の増幅および／または発現を指示するために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較してより多い転写および発現タンパク質のより高い産生を可能とし、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合には異種プロモーターが好ましい。

【0114】

原核生物宿主での使用に適切なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン (trp) プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた適切である。これらの配列は公開されており、これらの配列により、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらの配列を連結し得る。

【0115】

酵母宿主での使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞での使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0116】

Secs-1遺伝子発現を制御する際に目的となり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40初期プロモーター領域 (Bernois および Chambon, 1981, Nature 290:304-10)；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto ら, 1980, Cell 22:787-97)；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner ら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1444-45)；メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster ら, 1982, Nature 296:39-42)； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroff ら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75:3727-31)；またはtacプロモーター (DeBoer ら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80:21-25)。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた関心が高い：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI遺伝子制御領域 (Swift ら, 1984, Cell 38:639-46；Ornitz ら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986)；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515)；膵臓 β 細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22)；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl ら, 1984, Cell 38:647-58；Adames ら, 1985, Nature 318:533-38；Alexander ら, 1987, Mol. Cell Biol., 7:1436-44)；精巣細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、および肥満細胞において活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域 (Leder ら, 1986, Cell 45:485-95)；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert ら, 1987, Genes and Devel. 1:268-76)；肝臓において活性な α -フェットタンパク質遺伝子制御領域 (Krumlauf ら, 1985, Mol. Cell Biol., 5:1639-48；Hammer ら, 1987, Sci

ence 235:53-58); 肝臓において活性な $\alpha 1$ -抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, 1987, Genes and Devel. 1:161-71); 骨髄性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, 1985, Nature 315:338-40; Kolliasら, 1986, Cell 46:89-94); 脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, 1987, Cell 48:703-12); 骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature 314:283-86); ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, 1986, Science 234:1372-78)。

【0117】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のSecs-1ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは、比較的方向および位置に非依存性である。これらは、転写ユニットに対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェットタンパク質およびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、Secs-1核酸分子に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'側に配置される。

【0118】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書中に記載される隣接配列の1つ以上が予めベクター内に存在しない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0119】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSII (Stratagene, La Jolla, CA)、pET15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR- α (PCT公開番号WO 90/14363) ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY) が挙げられる。

【0120】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならぬことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、BlueScript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) のようなプラスミド、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPOTM TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen, Carlsbad, CA)、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech, Palo Alto, CA) が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0121】

ベクターが構築され、そしてSecs-1ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および／またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。Secs-1ポリペプチドについての発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、使用される宿主細胞の型にいくぶん関連する。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、上記に記載される。

10

【0122】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えば、E. coli）または真核生物宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合にSecs-1ポリペプチドを合成し、これは、続いて、培養培地から（宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合）収集され得るか、または直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される（そのポリペプチドが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）、および生物学的に活性な分子へと折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0123】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CHO DHFR (-) 細胞 (Urlaubら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 4216-20)、ヒト胚性腎臓 (HEK) 293または293T細胞、あるいは3T3細胞のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびげっ歯類細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠失し得るか、または優性に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissから誘導された3T3株、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHaKハムスター細胞株が挙げられる。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現に関する分野の当業者にとって公知であり入手可能である。

20

30

【0124】

同様に、本発明に適切な宿主細胞として有用なのは細菌細胞である。例えば、E. coli（例えば、HB101、DH5α、DH10、およびMC1061）の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の菌株もまた、本方法において使用され得る。

40

【0125】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0126】

さらに、望ましい場合には、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら, 1993, Biotechniques, 14: 81

50

0-17; Lucklow, 1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4: 564-72; および Lucklowら, 1993, J. Virol., 67: 4566-79 に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9 および Hi5 (Invitrogen) である。

【0127】

グリコシル化 Secs-1 ポリペプチドを発現するために、トランスジェニック動物がまた使用され得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物（例えば、雌ウシまたはヤギ）を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳汁中に得ることができる。Secs-1 ポリペプチドを産生するために、植物もまた使用し得るが、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療の用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。 10

【0128】

（ポリペプチド産生）

Secs-1 ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養素を含む。E. coli 細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および／または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および／または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、 20 これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要なように血清および／または増殖因子を補充され得る。昆虫培養物についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および／または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

【0129】

代表的に、トランスフェクトされた細胞または形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって指示される。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えられる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。 30

【0130】

宿主細胞によって産生される Secs-1 ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および／または DNA 結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイが挙げられる。

【0131】

Secs-1 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、Secs-1 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および／または核（真核宿主細胞について）に、あるいは、細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。 40

【0132】

宿主細胞細胞質および／または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかまたは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置する Secs-1 ポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌についての封入体を含む）は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジネート化、および／または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の内容物を放出するように溶解され得る。 50

【0133】

Secs-1ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、細胞内膜および／または細胞外膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後のペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、極端なpHで、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のpHで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のpHで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理されて、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解されたSecs-1ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。Secs-1ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびMarstonら, 1990, Meth. Enz., 182:264-75に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

10

【0134】

いくつかの場合、Secs-1ポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でなくても良い。ポリペプチドをその三次構造に「再折り畳み」または変換し、そしてジスルフィド結合を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドを、一定のpH（通常は、7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotrope）の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み／酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン／シスタミン、グルタチオン（GSH）／ジチオビスGSH、塩化銅、ジチオトレイトール（DTT）／ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール（bME）／ジチオ-b（ME）が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が、再折り畳みの効率を増加するのに使用され得るかまたは必要とされ得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

20

【0135】

封入体がSecs-1ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後の上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

30

【0136】

溶液からのSecs-1ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン（Secs-1ポリペプチド／ヘキサHis）のようなタグまたは他の小さなペプチド（例えば、FLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）またはmyc（Invitrogen, Carlsbad, CA））をそのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグに対して高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

40

【0137】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性で結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）は、Secs-1ポリペプチド／ポリHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8（Ausubelら編, Green Publishers Inc., およびWiley and Sons 1993）を参照のこと。

【0138】

さらに、Secs-1ポリペプチドは、Secs-1ポリペプチドを特異的に認識し得、

50

そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

【0139】

精製のための他の適切な手段としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）、続くゲル溶出、および調製等電点電気泳動（「Isoprime」machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせ得る。

【0140】

Secs-1ポリペプチドはまた、Merrifieldら, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら, 1985, Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; ならびに、StewartおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984) に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さずに合成され得る。化学的に合成されたSecs-1ポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化されて、ジスルフィド架橋を形成し得る。化学的に合成されたSecs-1ポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製された対応のSecs-1ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると予想され、従って、組換えまたは天然のSecs-1ポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

10

20

【0141】

Secs-1ポリペプチドを得る別の手段は、Secs-1ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および／または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、Secs-1ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたSecs-1ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用してモニターされ得る。

【0142】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、Secs-1ポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5, 824, 469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、この異種プールのオリゴヌクレオチドはそれぞれが、5'ランダム化配列、中央部の予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、予め決定された生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

30

40

【0143】

米国特許第5, 763, 192号；同第5, 814, 476号；同第5, 723, 323号；および同第5, 817, 483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的な遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、その確率論的な遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主細胞は、所望の

50

活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0144】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Athersys, Inc. によって出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650に記載される。これは、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、照射に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に中断点を配置し、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

10

【0145】

これらの方法はまた、包括的なSecs-1ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ（例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ（例えば、植物、マウスなど））において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0146】

（合成）

本明細書中に記載される核酸分子およびポリペプチド分子は、組換えおよび他の手段によって産生され得ることが、当業者によって理解される。

20

【0147】

（選択的結合因子）

用語「選択的結合因子」は、1以上のSecs-1ポリペプチドに対して特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なSecs-1ポリペプチド選択的結合因子は、Secs-1ポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのSecs-1ポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

30

【0148】

Secs-1ポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、一重特異的なポリクローナル抗体を含むポリクローナル抗体；モノクローナル抗体(MAb)；組換え抗体；キメラ抗体；ヒト化抗体（例えば、CDR移植化抗体）；ヒト抗体；単鎖抗体；および／または二重特異的抗体；ならびにそれらのフラグメント；改変体；または誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、Secs-1ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体の部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって産生されたFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現）によって産生されたフラグメントが挙げられる。

40

【0149】

Secs-1ポリペプチドに指向されたポリクローナル抗体は、一般に、Secs-1ポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。Secs-1ポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは有用であり得る。このキャリアタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫後、この動物は採血され

50

、そして血清を、抗 S e c s - 1 抗体力価についてアッセイする。

【0150】

S e c s - 1 ポリペプチドに指向されたモノクローナル抗体は、培養中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例として、K o h l e r ら、1975、N a t u r e 256 : 495-97 のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法 (K o z b o r 、1984、J . I m m u n o l . 133 : 3001 ; B r o d e u r ら、M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s 51-63 (M a r c e l D e k k e r , I n c . , 1987)) が挙げられる。S e c s - 1 ポリペプチドと反応性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。 10

【0151】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、この抗体において重鎖 (H) および／または軽鎖 (L) の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性であり、一方で、この鎖の残りの部分は、別の種に由来するか、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応の配列と同一であるか、または相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、このような抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第4, 816, 567号 ; M o r r i s o n ら、1985、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 81 : 6851-55を参照のこと。 20

【0152】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5, 585, 089号および同第5, 693, 762号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源からその抗体に導入される1以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野 (J o n e s ら、1986、N a t u r e 321 : 522-25 ; R i e c h m a n n ら、1998、N a t u r e 332 : 323-27 ; V e r h o e y e n ら、1988、S c i e n c e 239 : 1534-36) で記載される方法を使用して、げっ歯類の相補性決定領域 (C D R) の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域の代わりに置換することによって、実施され得る。 30

【0153】

S e c s - 1 ポリペプチドと結合するヒト抗体もまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリン産生の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物 (例えば、マウス) を使用して、このような抗体は、S e c s - 1 ポリペプチド抗原 (すなわち、少なくとも6個の連続するアミノ酸を有する) を用いて免疫することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、J a k o b o v i t s ら、1993、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 90 : 2551-55 ; J a k o b o v i t s ら、1993、N a t u r e 362 : 255-58 ; B r u g g e r m a n n ら、1993、Y e a r i n I m m u n o . 7 : 33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、重鎖および軽鎖の免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子座をその中で無能にし、そしてヒトの重鎖および軽鎖のタンパク質をコードする遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物 (この動物は、完全には補完されていない改変を有する) は、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得るために交雑される。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト (例えば、マウスではない) アミノ酸配列 (このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む) を有する抗体を産生する。P C T 出願番号 P C T / U S 9 6 / 0 5 9 2 8 および同 P C T / U S 9 3 / 0 6 9 2 6 を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5, 545, 807号、P C T 出願番号 P C T / U S 9 1 / 2 4 5 および同 P C T / G B 8 9 / 0 1 2 0 7、なら 40 50

びに欧州特許第546073B1号および同第546073A1号に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中での組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0154】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る (Hoo genboomら, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marksら, 1991, J. Mol. Biol. 222:581)。これらのプロセスは、糸状バクテリオファージ表面上の抗体レパートリーの提示を介した免疫選択、そして選択した抗原へのこれらの結合によるファージの引き続く選択を模倣する。このような技術の1つは、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用する、MPLレセプターおよびmskレセプターに対して高い親和性の抗体および機能的なアゴニスト抗体の単離が記載される。 10

【0155】

キメラ抗体、CDR移植抗体、およびヒト化抗体は、代表的には組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される材料および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）中で産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0156】

本発明の抗Secs-1抗体は、Secs-1ポリペプチドの検出および定量的ための任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接および間接的なサンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ）において使用され得る (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。これらの抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でSecs-1ポリペプチドと結合する。 20

【0157】

診断的適用のために、特定の実施形態において、抗Secs-1抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、または ^{67}Ga ）；蛍光化合物または化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る (Bay erら, 1990, Meth. Enz. 184:138-63)。 30

【0158】

競合結合アッセイは、標識した標準物質（例えば、Secs-1ポリペプチド、またはその免疫学的に反応性の部分）の能力に依存し、限定された量の抗Secs-1抗体との結合に関して、試験サンプル分析物（Secs-1ポリペプチド）と競合する。試験サンプル中のSecs-1ポリペプチドの量は、抗体と結合する標準物質の量と反比例する。結合する標準物質の量を決定するのを容易にするために、これらの抗体は、代表的には競合前または競合後に不溶化され、その結果これらの抗体と結合する標準物質および分析物は、結合しないままの標準物質および分析物から都合よく分離され得る。 40

【0159】

サンドイッチアッセイは、代表的には2つの抗体の使用を含み、各々の抗体は、検出および/または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分（すなわち、エピトープ）に結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、代表的には固体支持体上に固定される第1抗体によって結合され、その後、第2抗体が、この分析物に結合し、このようにして不溶性の3部分複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2抗体自体は、検出可能な部分で標識され得るか（直接的なサ 50

ンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る(間接的なサンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)(この場合、検出可能な部分は、酵素である)である。

【0160】

抗Secs-1抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボ画像化のために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流に投与され得、宿主中における標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

10

【0161】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらはそれぞれ、Secs-1ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、増強または減少させるかのいずれかである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、Secs-1ポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでSecs-1ポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子(例えば、アンタゴニスト抗体)は、Secs-1ポリペプチドの機能活性を、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、Secs-1ポリペプチド結合パート

20

【0162】

本発明はまた、Secs-1選択的結合因子(例えば、抗体)および生物学的サンプル中でSecs-1ポリペプチドレベルを検出するために有用である他の試薬を含むキットに関する。このような試薬として、検出可能な標識、ブロッキング血清、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬が挙げられ得る。

30

【0163】

(マイクロアレイ)

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体(例えば、ガラス)上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列(例えば、mRNA)とハイブリダイゼーションするための標識として作用する、単一の核酸種の多数のコピーを含む。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、mRNAは、細胞サンプルまたは組織サンプルからまず抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素学的に変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に提示される個々の遺伝子の発現は、各標的核酸分子に特異的に結合する、標識されたcDNAの量を定量することによって可視化される。このようにして、数千の遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、高スループットの並行様式で定量され得る。

40

【0164】

この高スループット発現プロファイリングは、本発明のSecs-1分子に関連して広範な用途を有し、これらとしては、以下が挙げられるが、これに限定されない:治療のための標的としての、Secs-1疾患関連遺伝子の同定および確認;関連するSecs-1分子およびそのインヒビターの分子毒性学;臨床試験のための集団の階層化および代理マーカーの産生;および高スループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を援助することによって、関連するSecs-1ポリペプチド低分子薬物の発見を増強すること

50

。

【0165】

(化学的誘導体)

Secs-1ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中の開示を考慮して、当業者によって調製され得る。Secs-1ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに自然に結合した分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の自然に結合した化学的な基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号2もしくは配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、または他のSecs-1ポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されるポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、このポリマーが結合するタンパク質は、水環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製物の治療的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

10

【0166】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2kDaと約100kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、幾つかの分子は上記の分子量より多く、幾つかの分子は上記の分子量より少ない重量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5kDaと約50kDaの間、より好ましくは、約12kDaと約40kDaとの間、そして最も好ましくは、約20kDaと約35Daとの間である。

20

【0167】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N結合型またはO結合型の炭水化物、糖、ホスフェート、ポリエチレングリコール（PEG）（これは、モノー（ C_1-C_{10} ）、アルコキシー、またはアリアルオキシーポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されるPEGの形態を含む）、モノメトキシーポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6kD）のデキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリー（N-ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびポリビニルアルコール。共有結合したSecs-1ポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

30

【0168】

一般に、化学的誘導体化は、活性化したポリマー分子とタンパク質とを反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：(a) 配列番号2もしくは配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、または他のSecs-1ポリペプチドが、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステル誘導体またはアルデヒド誘導体）とポリペプチドとを反応させる工程、および(b) 反応生成物を得る工程。最適な反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1実施形態において、Secs-1ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一ポリマー分子部分を有し得る。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

40

【0169】

ポリペプチドのペグ化（pegylation）は、当該分野で公知のペグ化反応のいずれかを使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Francisら, 1992, Focus on Growth Factors 3:4-10; 欧州特許第0154316号および同第0401384号; な

50

らびに米国特許第 4, 179, 337 号。例えば、ペグ化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有すべきである。還元アルキル化のために、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有すべきである。例えば、反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（これは水安定性である）またはそのモノ C₁ - C₁₀ アルコキシ誘導体もしくはアリールオキシ誘導体である（米国特許第 5, 252, 714 号を参照のこと）。

【0170】

別の実施形態において、Secs-1 ポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン／Secs-1 ポリペプチド分子は、アビジンに結合されて、4 価のアビジン／ビオチン／Secs-1 ポリペプチド分子が得られる。Secs-1 ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール（DNP）またはトリニトロフェノール（TNP）に共有結合され得、そして得られる結合体は、抗 DN P または抗 TNP-I g M と共に沈殿して、10 価の十量体の結合体を形成する。 10

【0171】

一般に、本発明の Secs-1 ポリペプチド誘導体の投与によって緩和または調節され得る条件は、Secs-1 ポリペプチドについて本明細書中に記載された条件を含む。しかし、本明細書中に開示される Secs-1 ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増大または減少した生物学的活性、あるいは他の特性（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。 20

【0172】

（遺伝子操作された非ヒト動物）

マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物であって、ここで、ネイティブな Secs-1 ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊（すなわち「ノックアウト」）され、その結果、Secs-1 ポリペプチドの発現レベルが有意に減少しているかまたは完全に消失している非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれる。このような動物は、米国特許第 5, 557, 032 号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【0173】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物であって、この動物の Secs-1 遺伝子の天然の形態または異種 Secs-1 遺伝子のいずれかが、この動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する、非ヒト動物をさらに含む。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第 5, 489, 743 号および PCT 公開番号 WO 94/28122 号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。 30

【0174】

本発明は、本発明の Secs-1 ポリペプチドについてのプロモーターの 1 以上が（例えば、相同組換え方法を使用することによって）活性化されるか、または不活化されるかのいずれかによって、ネイティブ Secs-1 ポリペプチドの 1 以上の発現のレベルが改変された、非ヒト動物をさらに含む。 40

【0175】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、Secs-1 遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生される Secs-1 ポリペプチドの量は、動物を薬物候補物に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物での薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはこれらに関連し得る。このような場合において、薬物候補物が遺伝子の発現を減少させる能力あるいは薬物候補物が病理学的状態を防止または阻害する能力を試験し得る。他の例 50

において、ポリペプチドのフラグメントのような、特定の代謝産物の産生により、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはこれらに関連し得る。このような場合において、薬物候補物がこのような代謝産物の産生を減少させる能力あるいは薬物候補物が病理学的状態を防止または阻害する能力を試験し得る。

【0176】

(Secs-1ポリペプチド活性の他のモジュレーターについてのアッセイ)
いくつかの状態において、Secs-1ポリペプチドの活性のモジュレーターである分子(すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト)を同定することが所望され得る。Secs-1ポリペプチドを調節する天然または合成の分子は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイのような、1以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソピボ様式またはインピボ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。 10

【0177】

「試験分子」とは、Secs-1ポリペプチドの活性を調節する(すなわち、増加または減少させる)ための能力について評価する分子をいう。最も一般的に、試験分子は、Secs-1ポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、Secs-1遺伝子発現に影響を与えることによって、またはSecs-1ポリペプチド結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)に結合することによって、Secs-1ポリペプチド活性を直接的に調節し得ることも意図される。1実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数(affinity constant)でSecs-1ポリペプチドと結合する。 20

【0178】

Secs-1ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、Secs-1ポリペプチドは、試験分子とSecs-1ポリペプチドとの相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

【0179】

特定の実施形態において、Secs-1ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、Secs-1ポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得る。Secs-1ポリペプチドの発現を調節する分子は、Secs-1ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはSecs-1ポリペプチドの発現を指向もしくは制御する核酸配列に対して相補的であって、かつ発現のアンチセンス調節因子として作用する核酸を含む。 30

【0180】

一旦、試験化合物がSecs-1ポリペプチドと相互作用すると同定されると、この分子は、Secs-1ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とSecs-1ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形態で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、Secs-1ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてSecs-1ポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。 40

【0181】

試験分子とSecs-1ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むSecs-1ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0182】

Secs-1ポリペプチドが、結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)と 50

の相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）への S e c s - 1 ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対する S e c s - 1 ポリペプチドの結合の速度および／または結合程度を増加または減少させる能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、S e c s - 1 ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定化される。次いで、放射標識した S e c s - 1 ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化した S e c s - 1 ポリペプチド結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一時に一方を（いずれかの順序で）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射能を計数して、結合パートナーが S e c s - 1 ポリペプチドに結合した程度を決定し得る。代表的に、分子は、ある濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上の要素を欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価において正確性に関して使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに S e c s - 1 ポリペプチド結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識した S e c s - 1 ポリペプチドをインキュベートし、そして S e c s - 1 ポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、C u r r e n 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、第18章（A u s u b e l ら編、G r e e n P u b l i s h e r s I n c. および W i l e y a n d S o n s 1995）を参照のこと。

10

20

【0183】

放射標識に対する代替として、S e c s - 1 ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンへと結合体化され得、次いで、ビオチン化されたタンパク質の存在が、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）またはアルカリホスファターゼ（A P））に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得、これらは、比色定量的に検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。S e c s - 1 ポリペプチドに対する抗体または S e c s - 1 ポリペプチド結合パートナーに対する抗体（これらは、ビオチンに結合されている）もまた、A PまたはH R Pに連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

30

【0184】

S e c s - 1 ポリペプチドまたは S e c s - 1 ポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定化され得る。基材-タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そして S e c s - 1 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体はカラム内に固定化され得、試験分子および相補タンパク質はカラムを通過し得る。S e c s - 1 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

40

【0185】

S e c s - 1 ポリペプチド結合タンパク質と S e c s - 1 ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、B I A c o r e アッセイシステム（P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J））である。B I A c o r e システムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、S e c s - 1 ポリペプチドまたは S e c s - 1 ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連

50

続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0186】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、Secs-1ポリペプチドとSecs-1ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける残りの工程は、本明細書中に記載される通りである。 10

【0187】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、Secs-1ポリペプチドとSecs-1ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0188】

Secs-1ポリペプチドとSecs-1ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、Secs-1ポリペプチドまたはSecs-1ポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌまたはげっ歯類の供給源由来である。Secs-1ポリペプチドの、Secs-1ポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、Secs-1ポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。 20

【0189】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、Secs-1遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるSecs-1ポリペプチドまたはSecs-1ポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実質的な影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力を試験し得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメントなど）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少させる薬物候補の能力を試験し得る。 30 40

【0190】

（内部移行タンパク質）

tatタンパク質配列（HIV由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号12）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT PDTを称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72；およびNagaharaら、1 50

998, Nat. Med. 4: 1449-52を参照のこと。これらの手順において、FITC構築物（FITC標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号13）（これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光活性化細胞分離（FACS）分析によって検出される。tat- β -gal融合タンパク質で処置された細胞は、 β -gal活性を示す。注射に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む）において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると思われる。

【0191】

10

従って、tatタンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、tatタンパク質配列を使用して、Secs-1アンタゴニスト（例えば、抗Secs-1選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、Secs-1分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「Secs-1分子」は、本明細書中に記載されるような、Secs-1核酸分子およびSecs-1ポリペプチドの両方をいう。所望ならば、Secs-1タンパク質自体もまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus, 1999, Science 285: 1466-67もまた参照のこと。

【0192】

20

（Secs-1ポリペプチドを使用する細胞供給源の同定）

本発明の特定の実施形態に従って、Secs-1ポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定し得ることが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定の実施形態において、Secs-1ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗Secs-1ポリペプチド抗体を使用して、細胞におけるSecs-1ポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

【0193】

30

（Secs-1ポリペプチド組成物および投与）

治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなSecs-1ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量のSecs-1ポリペプチドまたはSecs-1核酸分子を、投与の様式と適合するように選択される薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤と混合して含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上のSecs-1ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択される薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤と混合して含み得る。

【0194】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

40

【0195】

薬学的組成物は、例えば、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、におい、無菌性、安定性、解離または放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム（sodium hydrogen-sulfite））、緩衝液（例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリ

50

ドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン)、フィラー、単糖類、二糖類、および他の炭水化物(例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン)、タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン)、着色剤、香味剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン)、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン(例えば、ナトリウム)、保存剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素)、溶媒(例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール)、糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール)、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤(例えば、プルオニック(pluronic); PEG; ソルビタンエステル; ポリソルビテート(例えば、polysorbate 20またはpolysorbate 80); トリトン; トロメタミン; レシチン; コレステロールまたはチロキサポール(tyloxapal))、安定性増強剤(例えば、スクロースまたはソルビトール)、張度増強剤(例えば、ハロゲン化アルカリ金属(好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム)、またはマンニトール、ソルビトール)、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, A. R. Gennaro, 編, Mack Publishing Company 1990を参照のこと。

【0196】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、Secs-1分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0197】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、事実上、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注射のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理学的な生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充されている。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH 7.0~8.5のTris緩衝液または約pH 4.0~5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、Secs-1ポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出)と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、Secs-1ポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

【0198】

このSecs-1ポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達(例えば、経口的に)のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術範囲内にある。

【0199】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたは僅かに低いpH(典型的に、約5~約8のpH範囲内)にこの組成物を維持するために使用される。

【0200】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のSecs-1分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注射のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水で

あり、ここで、S e c s - 1 分子が、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物は、所望の分子と、薬剤（例えば、注射可能なミクロスフィア、生体腐食性（b i o - e r o d i b l e）粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソーム）との処方物を含み得、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御されたまたは持続された放出を提供する。ヒアルロン酸がまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

【0201】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、S e c s - 1 ポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。S e c s - 1 ポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧体と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液が噴霧され得る。肺投与が、P C T 公開番号 W O 9 4 / 2 0 0 6 9 にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

10

【0202】

特定の処方物が、経口投与され得ることがまた意図される。本発明の1つの実施形態において、この様式で投与される S e c s - 1 ポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身分解が最小化される場合、胃腸管内の点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、S e c s - 1 ポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた、使用され得る。

20

【0203】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量の S e c s - 1 ポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは重炭酸ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

30

【0204】

さらなる S e c s - 1 ポリペプチド薬学的組成物は、当業者に明らかであり、これらとしては、持続または制御送達処方物中に S e c s - 1 ポリペプチドを含む処方物が挙げられる。種々の他の持続または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体腐食性微粒子あるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、P C T / U S 9 3 / 0 0 8 2 9（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

【0205】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスが挙げられる。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸と γ エチルーL-グルタメートとのコポリマー（S i d m a n ら, 1983, B i o p o l y m e r s 22:547-56）、ポリ（2-ヒドロキシエチルーメタクリレート）（L a n g e r ら, 1981, J . B i o m e d . M a t e r . R e s . 15:167-277およびL a n g e r , 1982, C h e m . T e c h . 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（L a n g e r ら, 前出）またはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）が挙げられる。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知

40

50

のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、E p p s t e i nら、1985, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 82:3688-92; および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

【0206】

インビボ投与のために使用される S e c s - 1 薬学的組成物は、代表的に滅菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前に、またはその後のいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。 10

【0207】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

【0208】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（l y o s y r i n g e））を含むキットが含まれる。 20

【0209】

治療的に使用される S e c s - 1 薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、S e c s - 1 分子が使用されるための指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および一般的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（t i t e r）、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までの範囲であり得る。 30

【0210】

投薬の頻度は、使用される処方物中での S e c s - 1 分子の薬物動態学的パラメーターに依存する。典型的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、長期的に単一用量として、2以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そして当業者によって慣用的に実施される業務の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量-応答データの使用を介して確認され得る。 40

【0211】

薬学的組成物の投与の経路は、以下の公知の方法と一致する：例えば、経口的経路；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介する経路；徐放性システムによる経路；または移植デバイスによる経路。所望される場合、これらの組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0212】

あるいはまたはさらに、この組成物は、所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化され 50

た膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボラスまたは連続的な投与を介し得る。

【0213】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、Secs-1ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織、または器官が、Secs-1ポリペプチド薬学的組成物に曝露され、その後にそれらの細胞、組織または器官は患者に移植によって戻される。

【0214】

他の場合において、Secs-1ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法を使用して、Secs-1ポリペプチドを発現し、そして分泌するように遺伝的に操作された特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞はカプセル化され、周囲の組織の浸潤を回避し得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。

【0215】

本明細書中において議論されるように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を1つ以上のSecs-1ポリペプチドで処理することが、望ましくあり得る。このことは、細胞膜に対して透過性の形態である場合には、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

【0216】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写に対してサイレントなSecs-1遺伝子（すなわち、過少発現される遺伝子）を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のSecs-1ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0217】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。Kucherlapati, 1989, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36:301。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため（Thomasら、1986, Cell 44:419-28; ThomasおよびCapecci, 1987, Cell 51:503-12; Doetschmanら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:8583-87）、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため（Doetschmanら、1987, Nature 330:576-78）の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号；欧州特許第9193051号および同第505500号；PCT/US90/07642、ならびにPCT公開番号WO 91/09955）に記載されている。

【0218】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的（相同）であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、そして従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付

着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

【0219】

Secs-1ポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域（例えば、隣接配列）が、標的DNAのこれらの断片に付着する。例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムにおいて、所望のSecs-1ポリペプチドをコードするDNAの転写に影響を与えるのに十分に近位であり、かつそのような配向で挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの部分を制御する。従って、所望のSecs-1ポリペプチドの発現は、Secs-1遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろ、Secs-1遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA（目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む）の使用によって、達成され得る。

10

【0220】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位を含むDNAの導入によって、変化される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体（ゲノム）DNAに導入される（ここで、DNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結する）。染色体DNAへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化される。

20

【0221】

変化された遺伝子発現は、本明細書中で記載されるように、通常は得られたままの細胞においてサイレントな（発現されていない）遺伝子の活性化（または発現させる）、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少（排除を含む）させる。

30

【0222】

細胞の内在性Secs-1遺伝子からのSecs-1ポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5:521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225:890-900）を、細胞の内在性ゲノムSecs-1ポリペプチドコード領域の上流（すなわち、5'）に配置する工程を包含する。ゲノムSecs-1ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノム内のSecs-1ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組込まれ得る（BaubonisおよびSauer, 1993, Nucleic Acids Res., 21:2025-29; O'Garmanら、1991, Science 251:1351-55）。転写を増加させることが知られている任意の隣接配列（例えば、エンハンサー／プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性Secs-1遺伝子からの新たな（de novo）または増加したSecs-1ポリペプチド産生する新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で一体化する。

40

50

【0223】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノム *Secs-1* ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。適切な組換え酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え現象（欠失、転化、および転座）を生じ（*Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900*）、これは、細胞の内在性 *Secs-1* 遺伝子からの新規なまたは増加した *Secs-1* ポリペプチド産生を生じる新しいかまたは改変された転写ユニットを作製する。

【0224】

細胞の内在性 *Secs-1* 遺伝子からの *Secs-1* ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性 *Secs-1* 遺伝子からの新たなまたは増加した *Secs-1* ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こし、そして／または遺伝子（例えば、転写リプレッサ）の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞の内在性 *Secs-1* 遺伝子からの新たなまたは増加した *Secs-1* ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0225】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、例示的なDNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）制御配列、（c）エキソン、および（d）不對スプライスドナー部位。DNA構築物中の標的配列は、エレメント（a）～（d）の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（d）は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）制御配列、（c）エキソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター部位。ここで、標的配列は、エレメント（a）～（f）の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（f）は、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体DNAの予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、制御配列の3'であり、そしてスプライスドナー部位は、このエキソンの3'である。

【0226】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中で記載される *Secs-1* ポリペプチドの核酸配列）が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的なDNAの部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブのDNAの適切な制限によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に生じる場合、このDNAの部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、*Okazaki* フラグメントとして作用し、そしてDNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、*Secs-1* ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

【0227】

Secs-1 ポリペプチド細胞治療（例えば、*Secs-1* ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態の *Secs-1* ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このような *Secs-1* ポリペプチド産生細胞は、*Secs-1* ポリペプチドの天然産物である細胞であり得るか、または組換え細胞であって、その *Secs-1* ポリペプチドを産生する能力が、所望のポリペプチドをコードする遺伝子または *Secs-1* ポリペプチドの発現を増大する遺

10

20

30

40

50

伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。Secs-1ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、異種のポリペプチドの投与と共に生じる場合、Secs-1ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトSecs-1ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、Secs-1ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトSecs-1ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0228】

移植細胞は、周辺組織の浸透を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、Secs-1ポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、Secs-1ポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

【0229】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら（PCT公開WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り出し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボでダウンレギュレーションに供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、生きた細胞由来の分子のレシピエント内の特定の部位への送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、PCT公開WO91/10425（Aebischerら）に記載される。PCT公開WO91/10470（Aebischerら）；Winnら、1991, Exper. Neurol. 113:322-29；Aebischerら、1991, Exper. Neurol. 111:269-75；およびTrescoら、1992, ASAIO 38:17-23もまた参照のこと。

【0230】

Secs-1ポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るSecs-1ポリペプチドをコードするSecs-1遺伝子（ゲノムDNA、cDNAおよび／または合成DNAのいずれか）を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内在性Secs-1遺伝子に対してホモ接合性またはヘテロ接合性であるが、ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されるDNA分子（例えば、相同性組換えのために有用な内在性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優性を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化について）。細胞特異的内部移行因子、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含む。

【0231】

遺伝子治療DNA構築物は、次いで、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に導入され得る（エキソビボまたはインビボのいずれか）。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの

使用による。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質に残る。

【0232】

さらに他の実施形態において、制御エレメントが、標的細胞におけるSecs-1遺伝子の制御された発現のために含められ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性タンパク質）を二量化する低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（PCT公開WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

10

【0233】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、内在性小網における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを破壊し、その結果、このタンパク質が細胞から分泌され得る。Aridorら、2000, Science 287: 816-17およびRiveraら、2000, Science 287: 826-30を参照のこと。

20

【0234】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中に記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。ミフエプリストン（RU486）が、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。プロゲステロンアンタゴニストに対する、改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインの結合は、2つの転写因子の二量体の形成し、次いで、これらの転写因子が、核に入ってDNAに結合することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、そのレセプターがその天然のリガンドに結合する能力を排除するよう改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系は、米国特許第5,364,791号ならびにPCT公開番号WO96/40911およびWO97/10337に、さらに記載されている。

30

【0235】

なお別の制御系は、エクジソン（ショウジョウバエのステロイドホルモン）を使用し、これは、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこのレセプターを活性化する。次いで、このレセプターは、核に転移して、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）を結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメインを含む。エクジソン系は、米国特許第5,514,578号ならびにPCT公開番号WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162にさらに記載されている。

40

【0236】

別の制御手段は、ポジティブなテトラサイクリン制御可能トランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化させるポリペプチドに連結された、変異tetリプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランスアクチベータータンパク質（すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下で、tetオペレーターに結合する）を生じる変異tet R-4アミノ酸変化）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記

50

載されている。

【0237】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、Innovir Laboratories Inc. に対する米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号に記載されている。

【0238】

インビボ遺伝子治療は、Secs-1ポリペプチドをコードする遺伝子を、Secs-1核酸分子の局所的注射を介してかまたは他の適切なウイルス送達ベクターもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Hefiti, 1994, Neurobiology, 25:1418-35。例えば、Secs-1ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに含まれ得る(例えば、Johnson, PCT公開番号WO95/34670;およびPCT出願番号PCT/US95/07178を参照のこと)。組換えAAVゲノムは、代表的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結されたSecs-1ポリペプチドをコードするDNA配列に隣接する、AAV逆方向末端反復を含む。

10

【0239】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、肝炎ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、コロナウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、およびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含む、インビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達による、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号(アデノウイルスベクターを含む);米国特許第5,672,510号(レトロウイルスベクターを含む);および米国特許第5,635,399号(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む)に記載されている。

20

30

【0240】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNA送達(直接注入)、レセプター媒介移入(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサープロモーター、部位特異的組み込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系(安全性の尺度)、細胞特異的結合因子(細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号(エレクトロポレーション技術を含む)、米国特許第5,679,559号(遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する)、米国特許第5,676,954号(リポソームキャリアを含む)、米国特許第5,593,875号(リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する)、米国特許第4,945,050号(生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通しそしてこの細胞の内側に取り込まれる速度で推進されるプロセス、を記載する)、およびPCT公開番号WO96/40958(核リガンドを含む)に記載されている。

40

【0241】

Secs-1遺伝子治療または細胞治療が、同じまたは異なる細胞における1つ以上のさ

50

らなるポリペプチドの送達をさらに含み得ることがまた意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上記のカプセル化膜）内に含まれ得るか、または細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0242】

遺伝子治療を介して細胞における内因性 *Secs-1* ポリペプチド発現を増加させるための手段は、1つ以上のエンハンサーエレメントを *Secs-1* ポリペプチドプロモーターに挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、*Secs-1* 遺伝子の転写活性を増加させるよう作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーター活性化を与えることが公知であるエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、*Secs-1* ポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「オンにされる」場合には、*lck* プロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能性部分は、標準的なクローニング技術を使用して、*Secs-1* ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターおよび／または5'および／または3'隣接配列に挿入され得る）。次いで、この構築物（「相同組換え構築物」として公知）が、エキソビボでかまたはインビボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0243】

遺伝子治療はまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、*Secs-1* ポリペプチド発現を減少させるために、使用され得る。このような改変は、代表的に、相同組換え法を介して達成される。例えば、不活化について選択された *Secs-1* 遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーター片を除去および／または置換するように、操作され得る。例えば、プロモーターの転写アクチベーターのTATAボックスおよび／または結合部位が、標準的な分子生物学の技術を使用して、欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、これによって、対応する *Secs-1* 遺伝子の転写を抑制する。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、（調節される *Secs-1* 遺伝子と同じ種かまたは関連する種由来の）*Secs-1* ポリペプチドプロモーターの全てまたは関連する部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび／または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドが、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および／または挿入を介して変異される。その結果、TATAボックスおよび／またはアクチベーター結合部位は、活性が減少されているか、または完全に不活性にされている。この構築物はまた、代表的に、その改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな（内因性の）5'および3'DNA配列に対応する、少なくとも約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介して、適切な細胞に（エキソビボでかまたはインビボでかのいずれかで）導入され得る。代表的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組み込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター構築物における5'および3'DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介するその内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の組み込みを補助するよう作用し得る。

【0244】

（治療的使用）

Secs-1 核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、本明細書中に引用される疾患、障害または状態を含む、多くの疾患、障害または状態を処置、診断、改善または予防するために使用され得る。

【0245】

Secs-1 ポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストとしては、*Secs-1* ポリペプチド活性を調節し、そして *Secs-1* ポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加または減少する、アゴニスト分子およびアンタゴニスト分子が挙げられる。ア

ゴニストまたはアンタゴニストは、S e c s - 1 ポリペプチドと相互作用し、それによってその S e c s - 1 の活性を調節する、補因子（例えば、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質または低分子量分子）であり得る。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストとしては、S e c s - 1 ポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態のいずれかと反応する抗体が挙げられ、これらの形態は、S e c s - 1 タンパク質の細胞外ドメインの全てまたは一部を含む。S e c s - 1 ポリペプチド発現を調節する分子としては、代表的に、発現のアンチセンス調節因子として作用し得る、S e c s - 1 ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

【0246】

S e c s - 1 遺伝子は、インサイチュハイブリダイゼーションによって決定されるように、胃腸管において主に発現される。この発現パターンに基づいて、S e c s - 1 ポリペプチドは、胃腸の発達および機能において役割を果たし得る。従って、S e c s - 1 核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗 S e c s - 1 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）は、胃腸管を含む疾患の診断および／または処置において有用であり得る。このような疾患の例としては、胃腸の潰瘍、逆流性食道炎、小児脂肪便症、糖尿病、虚血再灌流障害、クローン病、炎症性腸疾患、ならびに細菌およびウイルス誘導性の感染および大腸炎が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、S e c s - 1 核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、化学療法または放射線誘導性の胃腸の損傷の処置において有用であり得る。胃腸の発達および機能に関連する他の疾患は、本発明の範囲によって含まれる。

【0247】

胃腸管における S e c s - 1 遺伝子の発現に基づいて、S e c s - 1 核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗 S e c s - 1 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）はまた、消化または代謝に関与する疾患の診断および／または処置のために有用であり得る。このような疾患の例としては、肥満、胃腸の逆流、憩室炎、憩室症、腸炎、およびえん下困難が挙げられるが、これらに限定されない。他のこのような代謝障害は、本発明の範囲によって含まれる。

【0248】

S e c s - 1 ポリペプチド発現は、舌および口腔粘膜において検出されているので、S e c s - 1 核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗 S e c s - 1 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）はまた、口腔に関連する疾患の診断および／または処置のために有用であり得る。このような疾患の例としては、歯周病、口腔癌、および化学療法または放射線誘導性の粘膜炎（m u c o s i t i s）が挙げられるが、これらに限定されない。口腔に関連する他の疾患が、本発明の範囲によって含まれる。

【0249】

腫瘍細胞および正常細胞における S e c s - 1 ポリペプチドの差示的な発現は、S e c s - 1 ポリペプチドが転移性疾患において役割を果たし得ることを示唆する。従って、S e c s - 1 核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗 S e c s - 1 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）は、癌の診断および／または処置において役割を果たし得る。このような疾患の例としては、結腸、胃、咽喉、食道、乳房、前立腺、子宮、精巣、または肺の癌が挙げられるが、これらに限定されない。他の癌および転移性疾患は、本発明の範囲によって含まれる。

【0250】

有意なレベルの S e c s - 1 ポリペプチド発現はまた、精巣および子宮において検出された。従って、S e c s - 1 核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗 S e c s - 1 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）は、妊孕性障害の診断および／または処置において役割を果たし得る。このような疾患の例としては、男性不妊、妊孕性強化、子宮内膜症、類線維腫（f i b r o i d）、または月経が挙げられるが、これらに限定されない。妊孕性に関連する他の障害は、本発明の範囲によって含ま

れる。

【0251】

増加したレベルの *Secs-1* ポリペプチド発現はまた、乾癬および創傷治癒モデルにおいて検出された。従って、*Secs-1* 核酸分子、ポリペプチド、それらのアゴニストおよびアンタゴニスト（抗 *Secs-1* 選択的結合因子を含むが、これに限定されない）は、乾癬および創傷治癒の診断および／または処置において役割を果たし得る。皮膚に関連する他の障害は、本発明の範囲によって含まれる。

【0252】

Secs-1 ポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適切であるように、1以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、および／または化学療法剤と組み合わせて（同時にまたは連続的に）使用され得る。 10

【0253】

Secs-1 ポリペプチドの所望でないレベルによって生じるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。所望でないレベルには、*Secs-1* ポリペプチドの過剰なレベルおよび *Secs-1* ポリペプチドの正常下のレベルが含まれる。

【0254】

（*Secs-1* 核酸および *Secs-1* ポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）を使用して、*Secs-1* 遺伝子および関連する遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、PCR増幅およびインサイ 20
チュハイブリダイゼーション）により行われ得る。

【0255】

Secs-1 核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、哺乳動物組織または体液サンプル中の *Secs-1* 核酸分子の存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0256】

他の方法はまた、1つ以上の *Secs-1* ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）または *Secs-1* mRNAに相補的でありかつこれらにハイブリダイズする核酸分子によりもた 30
らされ得る。例えば、アンチセンスDNA分子またはRNA分子（これらは、*Secs-1* 遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する）が、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示される *Secs-1* 遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各 *Secs-1* 遺伝子の開始部位（5'末端）に相補的である。このアンチセンス分子が、次いで、対応する *Secs-1* mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は、妨げられるかまたは減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物における *Secs-1* ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供 40
する。

【0257】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上の *Secs-1* ポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択された *Secs-1* ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAが調製され得、そして本明細書中に記載されるウイルス方法または非ウイルス方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的に、その生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0258】

さらに、*Secs-1* ポリペプチドは、生物学的に活性であっても活性でなくても、免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、抗体が惹起され得る、少なくとも1つのエピトープを含有する。*Secs-1* ポリペプチドに結合する選択的結合因子 50

(本明細書中に記載されるような)は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中のSecs-1ポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体もまた、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む、多数の疾患および障害を、予防、処置または診断するために使用され得る。これらの抗体は、Secs-1ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を減少またはブロックするようにSecs-1ポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合してSecs-1ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を増加し得る(Secs-1ポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む)。

【0259】

本発明のSecs-1ポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを使用して、Secs-1ポリペプチドレセプターをクローニングするために使用され得る。放射性標識(¹²⁵ヨウ素)したSecs-1ポリペプチドまたはアフィニティ/活性タグ化Secs-1ポリペプチド(例えば、Fc融合体またはアルカリホスファターゼ融合体)を結合アッセイにおいて使用して、Secs-1ポリペプチドレセプターを発現する細胞型、細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離されたRNAを、cDNAに変換し、哺乳動物発現ベクターにクローニングし、そして哺乳動物細胞(例えば、COSまたは293細胞)にトランスフェクトして発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射性標識化またはタグ化Secs-1ポリペプチドを、アフィニティリガンドとして使用して、Secs-1ポリペプチドレセプターを表面に発現する、このライブラリー中の細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、DNAを、これらの細胞から単離しそして哺乳動物細胞にトランスフェクトして、二次発現ライブラリー(ここで、Secs-1ポリペプチドレセプターを発現する細胞の画分は、元のライブラリーよりも何倍も高い)を作製し得る。この富化プロセスは、Secs-1ポリペプチドレセプターを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、繰り返し反復され得る。Secs-1ポリペプチドレセプターの単離は、Secs-1ポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性のSecs-1ポリペプチドレセプター、抗Secs-1ポリペプチドレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらは、本明細書中に記載される1つ以上の疾患または障害を、処置、予防、または診断するために使用され得る。

【0260】

マウスSecs-1ポリペプチドおよびヒトSecs-1をコードし、pSPORT1(Gibco-BRL)およびp7T73D(Pharmacia)にサブクローニングされ、そして登録番号PTA-1753およびPTA-1755を有する、cDNAの寄託を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(バージニア20110-2209、マナサス、ユニバーシティブルーバード10801)にて2000年4月25日に行った。

【0261】

以下の実施例は、例示目的のみのために意図され、本発明の範囲をいかなる様式でも限定するとは解釈されるべきではない。

【0262】

(実施例1:ヒトSecs-1ポリペプチド遺伝子およびマウスSecs-1ポリペプチド遺伝子のクローニング)

概して、Sambrookら(前出)に記載されるような材料および方法を使用して、ヒトSecs-1ポリペプチドおよびマウスSecs-1ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析した。

【0263】

プロテオームに基づくアプローチを使用して、扁平上皮細胞および直腸結腸癌腫細胞株から得た馴化培地由来の新規ペプチドを同定した。このペプチドを同定する際に利用したア

10

20

30

40

50

プローチは、このペプチドが天然に分泌する産物であることを示唆する。同定されたペプチドのアミノ酸配列を決定し、そしてGenBankデータベースと占有（proprietary）データベース（Amgen dbEST）との両方に存在するEST配列と配列同一性を共有することを見出した。具体的には、この新規分泌ペプチドのアミノ酸配列は、GenBankデータベース（GenBank登録番号AA283751）に存在するヒトEST配列に対応するアミノ酸配列と相同性を共有することが見出された。このEST配列に対応するcDNAクローンを、Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression（I. M. A. G. E.）Consortiumから得た（I. M. A. G. E. Consortiumクローン番号713624）。このcDNAクローンのヌクレオチド配列を決定し、そしてヒトSecs-1遺伝子に対する完全コード配列を含むことを見出した。 10

【0264】

ヒトSecs-1ポリペプチドに対する全長cDNAの配列分析は、この遺伝子が、81アミノ酸のタンパク質をコードし、そしてそのアミノ末端で24アミノ酸長の潜在的なシグナルペプチドを有する243bpのオープンリーディングフレームを含むことを示した（図2；推定シグナルペプチドを下線により示す）。図2は、ヒトSecs-1核酸配列のヌクレオチド配列およびヒトSecs-1ポリペプチドの推定アミノ酸配列を示す。ヒトSecs-1ポリペプチドは、51位（Asp）においてグリコシル化されることが見出された。 20

【0265】

マウスSecs-1遺伝子に対応する配列を、AC-6間質および結腸陰窩cDNAライブラリーからの占有データベースにおいて同定した。マウスSecs-1ポリペプチドcDNA配列を、以下のように単離した。総RNAを、AC-6間質細胞株または結腸陰窩組織のいずれかから、TRIzol（登録商標）法（Gibco-BRL, Rockville, MD）を使用して調製し、Dynabeads mRNAキット（Dynal, Lake Success, NY）を使用して、総RNAからmRNAを単離し、そしてSuperScriptTM システム（Gibco-BRL）およびNotIオリゴd（T）プライマー（Gibco-BRL）を使用して、単離されたmRNAから、cDNAを合成した。cDNA合成に続いて、SalIアダプター（Gibco-BRL）をこのcDNAに連結し、このcDNAをNotIで消化し、次いで消化したcDNAをアガロースゲルでサイズ選択した。約1.0kb以上のサイズのインサートを単離し、そしてpSPORT（Gibco-BRL）ベクターに連結した。連結産物を、DH10Bコンピテント細胞に形質転換し、次いで、選択されたクローンのヌクレオチド配列を分析した。 30

【0266】

マウスSecs-1ポリペプチドについての全長cDNAの配列分析は、この遺伝子が、78アミノ酸のタンパク質をコードし、そしてそのアミノ末端で24アミノ酸長の潜在的なシグナルペプチドを有する234bpのオープンリーディングフレームを含むことを示した（図1；推定シグナルペプチドを下線により示す）。図1は、マウスSecs-1核酸配列のヌクレオチド配列およびマウスSecs-1ポリペプチドの推定アミノ酸配列を示す。 40

【0267】

GenBankデータベースおよび占有データベースにおいて多数の相同配列を同定することに加えて、ヒトSecs-1核酸配列およびマウスSecs-1核酸配列は、以前に報告されたラットEST配列（Henniganら、1994、Oncogene 9：3591-600）と配列相同性を共有することが見出された。しかし、Henniganらは、ラットSecs-1核酸配列の一部のみを開示し、そしてラットSecs-1オルソログについてのオープンリーディングフレームを開示しなかった。図3は、全長ラットSecs-1ポリペプチド、マウスSecs-1ポリペプチド、およびヒトSecs-1ポリペプチドのアミノ酸配列アライメントを示す。ヒトとマウスとの両方のSecs- 50

1 ポリペプチドに関する推定アミノ酸配列を使用する S w i s s P r o t データベースの F A S T A 検索は、有意な相同性を共有する他の配列を何も同定しなかった。

【0268】

図 4 A ~ 4 F は、ヒト S e c s - 1 ポリペプチドに対するゲノムヌクレオチド配列を示す。ヒト S e c s - 1 ポリペプチドに対するゲノム配列を、公共に利用可能な B A C クローン (G e n B a n k 登録番号 A C 0 2 2 3 8 9) の分析によって決定した。このエキソンの位置およびこのエキソンからの推定アミノ酸配列を示す (図 4 A 、 4 D 、 および 4 F)

【0269】

(実施例 2 : S e c s - 1 m R N A 発現)

多数のヒト組織のノーザンブロット (占有か、または B i o S o u r c e , H a y w a r d , C A もしくは C l o n t e c , P a l o A l t o , C A から入手したかのいずれか) を、³²P-dCTP 標識した 542 bp のヒト S e c s - 1 P C R フラグメントでプローブした。ヒト S e c s - 1 P C R プローブを、25 ng の J u r k a t 細胞 c D N A 、ヒト S e c s - 1 遺伝子に対応するアンプリマー (5' - C - C - C - A - A - C - T - C - A - A - C - A - A - A - C - C - T - G - A - A - A - 3' ; 配列番号 14 および 5' - G - G - G - A - C - C - A - C - T - G - G - A - T - G - C - T - G - 3' ; 配列番号 15) (各々最終濃度 0.2 μM で) 、2.5 単位の T a q ポリメラーゼ、200 μM d N T P 、50 μC i ³²P-dCTP 、および 1 × T a p ポリメラーゼ緩衝液を使用して、25 μl の総反応容量で調製した。反応を、94 °C 2 分間で 1 サイクル ; 94 °C 20 秒間、57.8 °C 30 秒間、および 72 °C 1 分間で 40 サイクル ; ならびに 72 °C 5 分間で 1 サイクルで実施した。

【0270】

ノーザンブロットを、U L T R A h y b ^{T M} (A m b i o n , A u s t i n , T X) 中 42 °C で 1 時間、予備ハイブリダイズし、次いで、約 8 × 10⁴ c p m / μl の標識プローブを含む新鮮なハイブリダイゼーション緩衝液中 42 °C で一晩ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションに続いて、このフィルタを、2 × S S P E および 0.5 % S D S 中 50 °C で 30 分間 2 回洗浄し、次いで、0.1 × S S P E および 0.5 % S D S 中室温で 15 分間 2 回洗浄した。次いで、ブロットを、燐光画像機 (p h o s p h o i m a g e r) を使用して分析した。

【0271】

このノーザンブロットの分析は、1 kb の分子量を有する単一の転写物が、結腸および前立腺組織において発現されたことを示した。正常結腸における S e c s - 1 m R N A の発現は、結腸腫瘍における発現より 4 倍高いことが見出され、そして正常前立腺組織における S e c s - 1 m R N A の発現は、前立腺腫瘍における発現より高いことが見出された。

【0272】

S e c s - 1 m R N A の発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって位置決定した。正常胚組織および成体マウス組織のパネルを、4 % パラホルムアルデヒドに固定し、パラフィン中に埋包し、そして 5 μm に切断した。切断した組織を、0.2 M H C l 中で透過性にし、P r o t e i n a s e K で消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸を用いてアセチル化した。切片を、300 mM N a C l 、20 mM T r i s - H C l (p H 8.0) 、5 mM E D T A 、1 × デンハルト溶液、0.2 % S D S 、10 mM D T T 、0.25 mg / ml t R N A 、25 μg / ml ポリ A 、25 μg / ml ポリ C および 50 % ホルムアミド中 60 °C で 1 時間予備ハイブリダイズし、次いで 10 % デキストラン、およびマウス S e c s - 1 遺伝子に相補的な 2 × 10⁴ c p m / μl の ³³P 標識した 291 bp アンチセンスリボプローブを含む同じ緩衝液中 60 °C で一晩ハイブリダイズした。

【0273】

このリボプローブを、マウス S e c s - 1 c D N A 配列を含むクローンのインビトロ転

10

20

30

40

50

写によって得た。マウス *Secs-1* cDNA 配列を、RT-PCR によって、MSC 2.2.2 細胞由来の 100 μ g の総 RNA、マウス *Secs-1* 遺伝子に対応するアンプリマー（5'-A-C-T-C-C-G-G-C-T-C-C-T-T-C-A-C-T-A-T-G-A-3'；配列番号 16 および 5'-A-T-G-T-G-G-G-C-A-T-C-A-T-C-A-A-C-G-C-T-T-T-A-3'；配列番号 17）（各々 0.2 μ M の最終濃度で）、5 単位の Taq ポリメラーゼ、200 μ M dNTP、および 1 $\times$ Taq ポリメラーゼ緩衝液を、50 μ l の総反応容量で使用して、生成した。反応を、94 $^{\circ}$ C 2 分間で 1 サイクル；94 $^{\circ}$ C 20 秒間および 57 $^{\circ}$ C 30 秒間で 40 サイクル；ならびに 72 $^{\circ}$ C 5 分間で 1 サイクルで実施した。増幅に続いて、PCR 産物をアガロースゲルで分離し、このゲルから切り出し、QIAQuick Gel Extraction キット（Qiagen, Valencia, CA）を使用して精製し、そして pGEM-T（Promega, Madison, WI）ベクターに連結した。連結産物を DH5- α コンピテント細胞に形質導入し、そして 6 つのクローンを、制限酵素消化による分析および配列決定のために選択した。

【0274】

ハイブリダイゼーションに続いて、切片を緩衝液中でリンスし、RNase A で処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで 0.1 $\times$ SSC 中 55 $^{\circ}$ C で 30 分間洗浄した。次いで、切片を NTB-2 エマルジョン（Kodak, Rochester, NY）に浸漬し、4 $^{\circ}$ C で 3 週間露光し、現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色した。組織形態およびハイブリダイゼーションシグナルを、暗視野および標準の照射によって、脳（1 つの矢状部分および 2 つの冠状部分）、胃腸管（食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸、および遠位結腸）、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、睪臓、唾液腺、雄性および雌性の生殖器官（雌性における卵巣、卵管、および子宮；ならびに雄性における精巣、精巣上体、前立腺、精囊、および精管）、BAT および WAT（皮下、腎周）、骨（大腿）、皮膚、乳房、ならびに骨格筋に対して同時に分析した。

【0275】

Secs-1 プローブは、バックグラウンドが低い明白なシグナルを発生させた。胚組織と成体組織との両方において、最も強いシグナルは、胃腸系の上皮細胞において検出された。成体組織において、強い標識は、頬、腹側の舌、食道、および大腸の上皮細胞において特に見出された。中程度のシグナルは、遠位回腸において観察され、そして胃または小腸の近位部分においては発現が検出されなかった。中程度のレベルの発現は、胚の腸の上皮細胞において検出されたが、強いシグナルは、発生中の唾液腺において観察された。

【0276】

胃腸経以外に由来する組織において、中程度から強いシグナルは、精巣の精細管の発生中の精子細胞、子宮のいくらかの部分、および乳頭の上皮細胞において検出された。中程度のレベルの発現は、皮膚および鼻腔の上皮細胞において検出された。低レベルの発現もまた、リンパ節、脾臓、胸腺、ならびに前肢の上腕骨および尺骨において見出された。

【0277】

ヒト *Secs-1* mRNA およびマウス *Secs-1* mRNA の、いくつかのヒト腫瘍モデルまたは宿主または異種移植片における発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって分析した。マウス創傷治癒モデルおよび乾癬（薄片状の皮膚）モデルにおける、ヒト *Secs-1* mRNA およびマウス *Secs-1* mRNA の、いくつかの時点における発現もまた、インサイチュハイブリダイゼーションによって分析した。*Secs-1* ポリペプチドを、最初にヒト間質細胞および結腸直腸癌腫細胞株由来の馴化培地のプロテオーム解析によって、同定した。先のインサイチュハイブリダイゼーション実験において、口腔粘膜および胃腸管の上皮層における不連続な標識が観察された。予備研究はまた、*Secs-1* 遺伝子が結腸腫瘍および前立腺腫瘍においてダウンレギュレートされることを示した。

【0278】

292bpのマウスSecs-1プロンプ配列および504bpのヒトSecs-1プロンプ配列を含む構築物を、NcoIを用いて直鎖化し、そしてアンチセンス³³P標識RNAプロンプを、Sp6 RNAポリメラーゼを使用して、各構築物から合成した。インサイチュハイブリダイゼーションを、標準的なプロトコルを使用して、組織サンプルの5μmの切片（これは浸漬により固定され、そしてパラフィンに埋没している）を含むスライド上で実施した。組織サンプルを、55℃で一晩ハイブリダイズし、次いでSSC中で数回洗浄した（0.1×SSC中55℃で30分間の高ストリンジェンシーの洗浄）。洗浄に続いて、スライドをエマルジョンに3週間曝露し、次いで現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色した。

【0279】

図5および6は、インサイチュハイブリダイゼーションによって検出した場合の、ヒト類表皮癌腫（A431）異種移植片（図5）、またはヒト前立腺癌腫（PC-3）およびヒト結腸癌腫（HT-29）の細胞株（図6）における、ヒトSecs-1 mRNAおよびマウスSecs-1 mRNAの発現を示す。インサイチュハイブリダイゼーションをまた、ヒト結腸癌腫（HCT-116）細胞株を使用して実施した。わずかなSecs-1シグナルが、PC-3前立腺腫瘍（図6、最上列、中央パネルを参照のこと）またはHCT-116結腸腫瘍細胞株において検出された。中程度のSecs-1 mRNA発現が、HT-29結腸腫瘍細胞株の小さな集団において観察された（図6、第3列、中央パネルを参照のこと）。しかし、最も強いSecs-1 mRNA発現は、A431ヒト類表皮腫瘍異種移植片において検出された（図5、最上列、右側パネルを参照のこと）。この強いシグナルは、腫瘍塊全体で散乱して見られたが、腫瘍塊の表面ではなく深部において、より集中しているようであった。わずかなSecs-1発現が、壊死の領域において見出された。

【0280】

試験した異種移植片の型にかかわらず、マウス宿主の全てが、上にある皮膚上皮細胞において、強いSecs-1 mRNA発現のパッチを示し（図5、下列、右側パネル；図6、第2列、中央パネル；図6、最下列、中央パネルを参照のこと）、増殖中の細胞を示唆する。しかし、選択された異種移植片における増殖中の細胞に対するBrDu染色は、上皮におけるSecs-1 mRNA発現との対応を示さなかった（図6、右側パネル）。同様に、HT-29異種移植片におけるBrDu染色は、Secs-1 mRNAを発現する腫瘍性細胞のパッチとの対応を示さなかった。

【0281】

腫瘍異種移植片の上にある上皮におけるこのような強いSecs-1 mRNA発現事象を考慮して、さらなるインサイチュハイブリダイゼーションを実施して、非腫瘍マウス創傷治癒モデルにおける上皮細胞Secs-1 mRNA発現の一時的な変化を、皮膚穿刺生検に続く3つの時点で、試験した。図7は、この分析の結果を示す。損傷後3日目および4日目に、強いSecs-1 mRNA発現が、皮膚潰瘍の縁の増殖中の皮膚表皮において検出され（図7、第1列および第2列）、そしてサンプリングした表皮の大部分を含むように、この損傷から拡張した。最初の穿刺生検が表皮を除去したので、表皮細胞および従ってシグナルは、これらの初期の時点においては、潰瘍の下において観察されなかった。しかし、8日目までに、創傷の下表皮が再生され、そして強いSmac2 mRNA発現が検出され、このときシグナルは、損傷の縁へと、そしてそこを超えて拡張した。

【0282】

Secs-1 mRNA発現をまた、乾癬の変異体マウスモデル（薄片状の皮膚のマウス）において試験した。創傷治癒モデルの試験において得られた結果とは異なり、乾癬モデルは、慢性の、いくらかより組織崩壊する、過剰増殖性の表皮の存在を示すことがわかった。このモデルにおけるインサイチュハイブリダイゼーションは、正常コントロールにおける検出不可能なレベル（図7、第4列）と比較して、皮膚上皮細胞において、同じ強いSecs-1 mRNA発現を示した（図7、最下列）。

10

20

30

40

50

【0283】

(実施例4: Secs-1ポリペプチドの産生)

(A. 細菌における Secs-1ポリペプチドの発現)

ヒト Secs-1 細菌発現ベクターを調製するために、ヒト Secs-1 cDNA 配列を、最初に、ヒト Secs-1 遺伝子に対応する 0.4 pm/ml のアンプリマー (5' -A-A-A-T-A-A-C-A-T-A-T-G-A-A-A-C-G-T-C-G-T-C-C-A-G-C-T-A-A-A-G-C-C-T-G-G-T-C-A-G-G-C-3' ; 配列番号18 および 5' -G-G-T-G-A-T-G-G-T-G-A-T-G-G-T-G-C-C-C-C-3' ; 配列番号19)、ならびに2つの Ready-To-Go PCR ビーズ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を含む反応混合物 (50 µl の総反応容量) 中での 1 µg のヒト Secs-1 cDNA クローンの PCR 増幅によって調製した。反応を、94 °C 2 分間で1サイクル; 94 °C 45 秒間、55 °C 45 秒間、および 72 °C 45 秒間で30サイクルで実施した。この反応において生成した PCR 産物を、2% アガロースゲルでゲル精製した。

【0284】

この最初の増幅反応において生成したヒト Secs-1 PCR 産物を、次いで、ヒト Secs-1 遺伝子に対応する 0.4 pm/µl のアンプリマー (5' -A-A-A-T-A-A-C-A-T-A-T-G-A-A-A-C-G-T-C-G-T-C-C-A-G-C-T-A-A-A-G-C-C-T-G-G-T-C-A-G-G-C-3' ; 配列番号18 および 5' -G-T-G-G-T-A-G-T-G-G-T-A-G-T-G-G-T-A-G-T-A-A-C-T-A-T-C-C-T-A-G-G-T-A-T-T-T-3' ; 配列番号20) ならびに2つの Ready-To-Go PCR ビーズを含む反応混合物 (50 µl の総反応容量) 中で再増幅した。反応を、94 °C 2 分間で1サイクル; 94 °C 45 秒間、55 °C 45 秒間、および 72 °C 45 秒間で30サイクルで実施した。再増幅反応において使用したアンプリマー (amplifier) を、適切な制限部位をヒト Secs-1 cDNA 配列に組み込むように設計した。

【0285】

この pAMG21 (ATCC 番号98113) ベクター (これは、lux プロモーターおよびカナマイシン耐性遺伝子を含む)、および第2の増幅反応からの PCR 産物を、Bam HI および Nde I を用いて消化した。次いで、この PCR 産物を、ゲル精製して、そして pAMG21 中に連結した。この連結産物を、エレクトロポレーションにより、GM121 (ATCC 番号202174) コンピテント細胞に形質転換し、そしてカナマイシン耐性について形質転換体を選択した。次いで、選択されたコロニーから単離されたプラスミド DNA を、配列分析に供した。

【0286】

形質転換した宿主細胞を、誘導の前に、40 µg/ml のカナマイシンを含む 2XYT 培地 (30 °C) 中でインキュベートした。遺伝子の発現を、N-(3-オキソヘキサノイル)-D-グルタミン酸の最終濃度 (100 ng/ml) までの添加によって誘導し、続いて、4時間、30 °C でインキュベートした。この培養物を遠心分離し、そして細菌ペレットを再懸濁および溶解し、次いで SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により宿主細胞タンパク質を分析することによって、ヒト Secs-1 ポリペプチドの発現を評価した。

【0287】

(B. 哺乳動物細胞における Secs-1ポリペプチドの発現)

PCR を用いて、Secs-1 ポリペプチドをコードするテンプレート DNA 配列を増幅する。この PCR には、この配列の 5' および 3' 末端に対応するプライマーを用いる。増幅した DNA 産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。PCR 産物をゲル精製し、そして標準的組み換え DNA 方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。エプスタイン-バーウイルス複製起点を含む代表的な

発現ベクターである pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を、293-EbNA-1 細胞における Secs-1 ポリペプチドの発現のために用いる。増幅およびゲル精製した PCR 産物を、pCEP4 ベクターに連結し、そしてリポフェクションによって 293-EbNA 細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、100 μ g/mL のハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物をコンフルエンスになるまで増殖させる。次いで、この細胞を無血清培地中で 72 時間培養する。馴化培地を取り出し、Secs-1 ポリペプチド発現を SDS-PAGE によって分析する。

【0288】

Secs-1 ポリペプチド発現は、銀染色によって検出できる。あるいは、Secs-1 ポリペプチドを、ペプチドタグに対する抗体を用いてウエスタンブロット分析によって検出可能である、エピトープタグ（例えば、IgG 定常ドメインまたは FLAG エピトープ）を有する融合タンパク質として生成する。 10

【0289】

Secs-1 ポリペプチドを、SDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出し得るか、または Secs-1 融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして本明細書に記載のような N 末端アミノ酸配列分析に供する。

【0290】

(C. 哺乳動物細胞における Secs-1 ポリペプチドの発現および精製)
リポフェクションまたはリン酸カルシウムプロトコルのいずれかを用いて、293 EbNA 細胞または CHO 細胞中に、Secs-1 ポリペプチド発現構築物を導入する。 20

【0291】

生成される Secs-1 ポリペプチドに対する機能的研究を行うため、ハイグロマイシン選択 293 EbNA クローンのプールから大量の馴化培地を生成する。この細胞を 500 cm Nunc Triple Flasks 中で、80% コンフルエンスになるまで培養し、その後、培地を回収する 1 週間前に無血清培地に切り換える。馴化培地を回収し、そして精製まで -20 °C に凍結する。

【0292】

馴化培地を下記のとおり、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。この培地を解凍し、次いで 0.2 μ m フィルターに通す。プロテイン G カラムを PBS で pH 7.0 に平衡化し、次いで濾過した培地をロードした。このカラムを A₂₈₀ の吸収がベースラインに達するまで PBS で洗浄する。0.1 M Glycine-HCl を用いて pH 2.7 で、Secs-1 ポリペプチドをカラムから溶出し、直ちに 1 M Tris-HCl を用いて pH 8.5 で中和する。Secs-1 ポリペプチドを含有する画分をプールし、PBS 中で透析し、そして -70 °C で貯蔵した。 30

【0293】

ヒト Secs-1 ポリペプチド-Fc 融合ポリペプチドの第 Xa 因子切断について、アフィニティークロマトグラフィー精製したタンパク質を、50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、2 mM CaCl₂ 中で pH 8.0 で透析する。制限プロテアーゼ第 Xa 因子を、透析したタンパク質に 1/100 (w/w) で添加し、そしてこのサンプルを室温で一晩消化する。 40

【0294】

(実施例 4：抗 Secs-1 ポリペプチド抗体の産生)
Secs-1 ポリペプチドに対する抗体を、Hudson および Bay、Practical Immunology (第二版、Blackwell Scientific Publications) に記載される手順を使用して生成した。具体的に、ウサギを、化学的に合成した Secs-1 ペプチド (C-W-V-V-P-G-A-L-P-Q-I；配列番号 21) を用いて、免疫した。免疫前に、この Secs-1 ペプチド配列を、製造業者により提示されたプロトコルに従って、Maleimide Conjugat 50

ion Buffer (Pierce Chemical, Rockford, IL) を使用して、K-L-H に連結した。ウサギに、Secs-1 ペプチドを注射し、次いで、十分な血清力価レベル (酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA) により決定される) を有するこれらの動物を、ポリクローナル抗体の産生のために選択した。

【0295】

(実施例 5: トランスジェニックマウスにおける Secs-1 ポリペプチドの発現)
Secs-1 ポリペプチドの生物学的活性を評価するため、肝臓特異的 ApoE プロモーターの制御下で Secs-1 ポリペプチド / Fc 融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達により、Secs-1 ポリペプチドの機能に関する情報を与える病理的变化を生じることが期待される。同様に、 β アクチンプロモーターの制御下で全長 Secs-1 ポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達により、遍在性発現を生じることが期待される。 10

【0296】

これらの構築物を生成するために、PCR を用いて、Secs-1 ポリペプチドをコードするテンプレート DNA 配列を増幅する。この PCR には、所望の配列の 5' および 3' 末端に対応するプライマーを用いる。そしてこの配列は、発現ベクター内への増幅産物の挿入を可能にするために制限酵素部位を組み込む。増幅後、PCR 産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組み換え DNA 技術を用いて発現ベクター中に連結する。例えば、増幅した Secs-1 ポリペプチド配列を、Graham ら、1997、Nature Genetics, 17: 272~74 および Ray ら、1991 Genes Dev. 5: 2265~73 に記載のように、ヒト β アクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクロニングし得る。 20

【0297】

連結 (ライゲーション) 後、反応混合物を用いて、E. coli 宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性で選択する。選択したコロニー由来のプラスミド DNA を単離して、DNA 配列決定に供し、適切なインサートの存在および変異が存在しないことを確認する。Secs-1 ポリペプチド発現ベクターを、2 回の CsCl 密度勾配遠心分離を通じて精製し、適切な制限酵素で切断し、そして、Secs-1 ポリペプチド導入遺伝子を含む直線フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを、5 mM Tris (pH 7.4) および 0.2 mM EDTA 中で、2 mg/mL の濃度で、再懸濁する。 30

【0298】

BDF1 $\times$ BDF1 交配マウス由来の単一細胞胚を、記載 (PCT 公開番号 WO 97/23614) のように注射する。胚を、CO₂ インキュベーター中で一晩培養し、そして 15~20 の 2 細胞胚を偽妊娠 CD1 雌性マウスの卵管に移す。マイクロインジェクションした胚の着床から得た子孫を、以下のように、ゲノム DNA サンプル中に取り込まれた導入遺伝子の PCR 増幅でスクリーニングする。耳切片を 20 mL の耳緩衝液 (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS、および 500 mg/mL プロテイナーゼ K) 中で、55°C で一晩消化する。次いで、このサンプルを 200 mL の TE で希釈し、そして 2 mL の耳サンプルを、適切なプライマーを用いる PCR 反応中で用いる。 40

【0299】

8 週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理分析のため、屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そして Total RNA Extraction Kit (Qiagen) を用いて、脾臓から、総細胞 RNA を単離し、そして導入遺伝子発現を、RT-PCR によって決定する。脾臓から回収した RNA を、以下のように、SuperScriptTM Pre-amplification System (Gibco-BRL) を用いて cDNA に変換する。適切なプライマー (発現ベクター中の Secs-1 ポリペプチド導入遺伝子の 3' 側に位置する) を用いて、導入遺伝子転写物から cDNA 合成をプライムする。トランスジェニック創始動物およびコントロール由 50

来の10mgの総脾臓RNAを、1mMのプライマーとともに、10分間70℃でインキュベートし、そして氷上に置く。次いで、反応物に、10mM Tris-HCl、pH 8.3、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、10mMの各dNTP、0.1mM DTT、および200UのSuperScript II逆転写酵素を補充する。42℃で50分間のインキュベーション後、72℃で15分間加熱することによって反応を停止し、2UのRNase Hを用いて20分間37℃で消化する。次いで、サンプルをSecs-1ポリペプチドに特異的なプライマーを用いるPCRによって増幅する。

【0300】

(実施例6：トランスジェニックマウスにおけるSecs-1ポリペプチドの生物学的活性)

安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルオロラン (isoflurane) によって麻酔し、そして心臓穿刺によって採血する。サンプルを、血液学および血清化学分析に供する。X線撮影を、最終的な放血後に行う。肉眼での解剖の際に、主な内臓器官を、重量分析に供する。

【0301】

肉眼での解剖後、組織 (すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋) を取出し、そして10%緩衝化Zn-ホルマリン中で組織学的検査のために固定する。固定後、組織をパラフィンブロック中で処理し、そして3mmの切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、次いで組織学的分析に供する。

【0302】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下の通りにB細胞特異的抗体およびT細胞特異的抗体を用いた免疫組織学的分析に供する。ホルマリンで固定したパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。切片を3%過酸化水素でクエンチし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウスB220およびCD3 (Harlan, Indianapolis, IN) 中でインキュベートする。抗体結合を、色素原 (chromagen) としてDAB (BioTek, Santa Barbara, CA) を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, CA) によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

【0303】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロールの同腹仔由来の脾臓および胸腺のMLNおよび切片を取出す。シリンジの平らな末端を用いて100mmナイロン性細胞ストレーナー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) の底に対してこの組織を穏やかに粉碎することによって単細胞懸濁物を調製する。細胞を2回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の約 1×10^6 細胞を、20μL容量において0.5μg CD16/32 (FcγII/II) Fcブロックで10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、FITCまたはPEに結合体化した、CD90.2に対するモノクローナル抗体 (Thy-1.2)、CD45Rに対するモノクローナル抗体 (B220)、CD11bに対するモノクローナル抗体 (Mac-1)、Gr-1に対するモノクローナル抗体、CD4に対するモノクローナル抗体またはCD8に対するモノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) の0.5μg抗体を用いて、100μL容量のPBS (Ca⁺ およびMg⁺ を欠く)、0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.01%アジ化ナトリウム中で2~8℃で30分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いでFACScan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーによって分析する。

【0304】

10

20

30

40

50

(実施例7：マウス S e c s - 1 ポリペプチドの生物学的活性)

実施例6において調製される S e c s - 1 ポリペプチド／F c 融合構築物を使用して、増殖因子の F G F ファミリーのメンバーへの S e c s - 1 ポリペプチドの直接的な結合を分析する。

【0305】

骨髓間質細胞株中での S e c s - 1 ポリペプチドの発現は、間質細胞の造血幹細胞を維持する能力と相関することを示した。間質細胞の造血幹細胞を維持する能力が、S e c s - 1 ポリペプチドの発現に単に相関しているというのではなく起因する場合、非支持性間質細胞株中での S e c s - 1 ポリペプチドの発現が、この細胞株を支持性細胞株に変換する。同様に、S T 2 細胞中での S e c s - 1 の発現が、デキサメタゾンおよびビタミン D 3 の非存在下において、これらの細胞に破骨細胞形成 (o s t e o c l a s t o g e n e s i s) を支持させる場合、この結果は、デキサメタゾンおよびビタミン D 3 による S e c s - 1 ポリペプチドの発現の強力な誘導が、単に無害のバイスタンダー (b y s t a n d e r) 効果であるだけでなく、この破骨細胞支持表現型の出現に原因として関与することを示唆する。

10

【0306】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、改変および修飾が当業者に思い浮かぶことが理解される。それゆえ、添付の特許請求の範囲が、本願発明の範囲内に入る全てのこのような均等な改変物を包含することが意図される。

【図面の簡単な説明】

20

【図1】

図1は、マウス S e c s - 1 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1)、およびマウス S e c s - 1 ポリペプチドの推定のアミノ酸配列 (配列番号2) を例示する。推定シグナルペプチドを示す (下線部)。

【図2】

図2は、ヒト S e c s - 1 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号4)、およびヒト S e c s - 1 ポリペプチドの推定のアミノ酸配列 (配列番号5) を例示する。推定シグナルペプチドを示す (下線部)。

【図3】

図3は、ラット S e c s - 1 ポリペプチド (配列番号7)、マウス S e c s - 1 ポリペプチド (配列番号2) およびヒト S e c s - 1 ポリペプチド (配列番号5) のアミノ酸配列アライメントを例示する。

30

【図4】

図4A-4Fは、ヒト S e c s - 1 ポリペプチド (配列番号8) についてのゲノムヌクレオチド配列を例示する。エキソンの位置および推定アミノ酸配列 (配列番号9~11) を示す。

【図5】

図5は、ヒト類表皮癌 (A 4 3 1) 異種移植片におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出したときのヒト S e c s - 1 (h u S e c s 1) m R N A およびマウス S e c s - 1 (m u S m a c 2) m R N A の発現を例示する。

40

【図6】

図6は、ヒト前立腺癌腫 (P C - 3) 細胞株およびヒト結腸癌腫 (H T - 2 9) 細胞株におけるインサイチュハイブリダイゼーションによって検出したときのヒト S e c s - 1 (h u S e c s 1) m R N A およびマウス S e c s - 1 (m u S m a c 2) m R N A の発現を例示する。

【図7】

図7は、創傷治癒および乾癬 (鱗状) 皮膚モデルにおける異なる時点でのインサイチュハイブリダイゼーションによって検出したときのマウス S e c s - 1 (m u S m a c 2) m R N A の発現を例示する。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/98497 A1

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/435, 14/47, 16/18, 16/46, 17/08, C12Q 1/68, A61K 38/17, C01N 33/53, 33/56
- (21) International Application Number: PCT/US00/32479
- (22) International Filing Date: 28 November 2000 (28.11.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/599,067 21 June 2000 (21.06.2000) US
09/724,000 28 November 2000 (28.11.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications: 09/599,067 (CIP) Filed on 21 June 2000 (21.06.2000) US
Not furnished (CIP) Filed on 28 November 2000 (28.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): POLVERINO, Anthony, J. [AU/US]; 3850 Maratta Circle, Thousand Oaks, CA (US).
- (81) Designated States (national): AE, AF, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, 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 (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, UZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SECRETED EPITHELIAL COLON STROMAL-1 POLYPEPTIDES, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE SAME AND USES THEREOF

1 50

rat Secs-1 MRLTLISGLF FMLPLCLCVL SSGRRKPAK F...PKLRFR CHLSPRSKPT

murine Secs-1 MRLTLISGLF FMLPLCLCVL SSGRRKPAK S...LKLRRR CHLSPRSKPT

human Secs-1 MRLTLISGLF FMLPLCLCVL SSGRRKPAK AWSGRRLRC CHRVSPFNST

51 81

rat Secs-1 TWKRNHTTRPC RPCR KLRN SWVVGALPQ T

murine Secs-1 TWKRNHTTRPC RPCR KLRN SWVVGALPQ T

human Secs-1 NLSGRHVRKLC RPCR KLRN SWVVGALPQ V

(57) Abstract: The present invention provides novel Secreted Epithelial Colon Stromal-1 (Secs-1) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing Secs-1 polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with Secs-1 polypeptides.

WO 01/98497 A1

WO 01/98497

PCT/US00/32479

SECRETED EPITHELIAL COLON STROMAL-1 POLYPEPTIDES, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE
SAME AND USES THEREOF

Field of the Invention

5 The present invention relates to novel Secreted Epithelial Colon Stromal-1
(Secs-1) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention
also relates to selective binding agents, vectors, host cells, and methods for
producing Secs-1 polypeptides. The invention further relates to pharmaceutical
compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or
10 prevention of diseases, disorders, and conditions associated with Secs-1
polypeptides.

Background of the Invention

Technical advances in the identification, cloning, expression, and
15 manipulation of nucleic acid molecules and the deciphering of the human genome
have greatly accelerated the discovery of novel therapeutics. Rapid nucleic acid
sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented
rates and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping
sequences into partial and entire genomes and the identification of polypeptide-
20 encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a
database compilation of known amino acid sequences allows one to determine the
extent of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks.
The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid
molecule provides a polypeptide product for structural and functional analyses. The
25 manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides may confer
advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

In spite of the significant technical advances in genome research over the
past decade, the potential for the development of novel therapeutics based on the
human genome is still largely unrealized. Many genes encoding potentially
30 beneficial polypeptide therapeutics or those encoding polypeptides, which may act
as "targets" for therapeutic molecules, have still not been identified.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Accordingly, it is an object of the invention to identify novel polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

5 Summary of the Invention

The present invention relates to novel Secs-I nucleic acid molecules and encoded polypeptides.

The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- 10 (a) the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4;
- (b) the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 or PTA-1755;
- (c) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either
- 15 SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (d) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (c); and
- (e) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (c).

20 The invention also provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set
- 25 forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 or PTA-1755, or (a);
- 30 (c) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 or PTA-1755, (a), or

WO 01/98497

PCT/US00/32479

(b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic;

(d) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 or PTA-1755, or any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (d); and

(f) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (d).

10

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid

WO 01/98497

PCT/US00/32479

deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

- (f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- (g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (f); and
- (h) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (c).

10 The present invention provides for an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and
 - (b) the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC
- 15 Deposit Nos. PTA-1753 or PTA-1755.

The invention also provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 6, optionally further comprising an amino-terminal methionine;
 - (b) an amino acid sequence for an ortholog of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
 - (c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
 - (d) a fragment of the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic; and
- 20
- 25
- 30

WO 01/98497

PCT/US00/32479

(e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 or PTA-1755, or any of (a) - (c).

5

The invention further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and

(e) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

Also provided are fusion polypeptides comprising Secs-1 amino acid sequences.

The present invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells

WO 01/98497

PCT/US00/32479

comprising the recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a method of producing a Secs-1 polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced.

5 A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding a Secs-1 polypeptide is also encompassed by the invention. The Secs-1 nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of a Secs-1 polypeptide, which may include increased circulating levels. Alternatively, the Secs-1 nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that prevents expression of endogenous Secs-1 polypeptide (*i.e.*, generates a transgenic animal possessing a Secs-1 polypeptide gene knockout). The transgenic non-human animal is preferably a mammal, and more preferably a rodent, such as a rat or a mouse.

10 Also provided are derivatives of the Secs-1 polypeptides of the present invention.

15 Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the Secs-1 polypeptides of the invention. Such antibodies and peptides may be agonistic or antagonistic.

Pharmaceutical compositions comprising the nucleotides, polypeptides, or selective binding agents of the invention and one or more pharmaceutically acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleotides or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents.

25 The Secs-1 polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, and/or detect diseases and disorders, including those recited herein.

The present invention also provides a method of assaying test molecules to identify a test molecule that binds to a Secs-1 polypeptide. The method comprises 30 contacting a Secs-1 polypeptide with a test molecule to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises

WO 01/98497

PCT/US00/32479

determining whether such test molecules are agonists or antagonists of a Secs-1 polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of Secs-1 polypeptide or on the activity of Secs-1 polypeptide.

5 Methods of regulating expression and modulating (*i.e.*, increasing or decreasing) levels of a Secs-1 polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding a Secs-1 polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of a Secs-1 polypeptide may be
10 administered. Examples of these methods include gene therapy, cell therapy, and anti-sense therapy as further described herein.

In another aspect of the present invention, the Secs-1 polypeptides may be used for identifying receptors thereof ("Secs-1 polypeptide receptors"). Various forms of "expression cloning" have been extensively used to clone receptors for
15 protein ligands. See, *e.g.*, Simonsen and Lodish, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:437-41 and Tartaglia *et al.*, 1995, *Cell* 83:1263-71. The isolation of a Secs-1 polypeptide receptor is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the Secs-1 polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble Secs-1 polypeptide receptors, anti-Secs-1 polypeptide
20 receptor-selective binding agents (such as antibodies and derivatives thereof), small molecules, and antisense oligonucleotides, any of which can be used for treating one or more disease or disorder, including those disclosed herein.

Brief Description of the Figures

25 Figure 1 illustrates the nucleotide sequence of the murine Secs-1 gene (SEQ ID NO: 1) and the deduced amino acid sequence of murine Secs-1 polypeptide (SEQ ID NO: 2). The predicted signal peptide is indicated (underlined);

Figure 2 illustrates the nucleotide sequence of the human Secs-1 gene (SEQ ID NO: 4) and the deduced amino acid sequence of human Secs-1 polypeptide (SEQ ID NO: 5). The predicted signal peptide is indicated (underlined);
30

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Figure 3 illustrates the amino acid sequence alignment of rat Secs-1 polypeptide (SEQ ID NO: 7), murine Secs-1 polypeptide (SEQ ID NO: 2), and human Secs-1 polypeptide (SEQ ID NO: 5);

5

Figures 4A-4F illustrate the genomic nucleotide sequence for human Secs-1 polypeptide (SEQ ID NO: 8). The location and deduced amino acid sequence of the exons (SEQ ID NOS: 9-11) are indicated;

10 Figure 5 illustrates the expression of human Secs-1 (huSecs1) mRNA and murine Secs-1 (muSmac2) mRNA as detected by *in situ* hybridization in a human epidermoid carcinoma (A431) xenograft;

15 Figure 6 illustrates the expression of human Secs-1 (huSecs1) mRNA and murine Secs-1 (muSmac2) mRNA as detected by *in situ* hybridization in human prostate carcinoma (PC-3) and human colon carcinoma (HT-29) cell lines;

Figure 7 illustrates the expression of murine Secs-1 (muSmac2) mRNA as detected by *in situ* hybridization at different time points in wound healing and psoriasis (flaky) skin models.

20

Detailed Description of the Invention

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All references cited in this application are expressly incorporated by reference herein.

25

Definitions

The terms "Secs-1 gene" or "Secs-1 nucleic acid molecule" or "Secs-1 polynucleotide" refer to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or

30

WO 01/98497

PCT/US00/32479

SEQ ID NO: 5, a nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 or PTA-1755, and nucleic acid molecules as defined herein.

The term "Secs-1 polypeptide allelic variant" refers to one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

The term "Secs-1 polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of Secs-1 polypeptide amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when total nucleic acid is isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refers to a DNA or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N⁶-methyladenosine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxy/methyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N⁶-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N⁶-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-

methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "vector" is used to refer to any molecule (e.g., nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

The term "expression vector" refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "Scs-1 polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 and related polypeptides.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Related polypeptides include Secs-1 polypeptide fragments, Secs-1 polypeptide orthologs, Secs-1 polypeptide variants, and Secs-1 polypeptide derivatives, which possess at least one activity of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Secs-1 polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino-terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "Secs-1 polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. The term "Secs-1 polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of Secs-1 polypeptide orthologs, Secs-1 polypeptide derivatives, or Secs-1 polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by Secs-1 polypeptide allelic variants or Secs-1 polypeptide splice variants. Secs-1 polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of a Secs-1 polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 30 amino acids, or about 40 amino acids, or about 50 amino acids, or about 60 amino acids, or about 70 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids. Such Secs-1 polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to Secs-1 polypeptides.

The term "Secs-1 polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to Secs-1 polypeptide amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. For example, mouse and human Secs-1 polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "Secs-1 polypeptide variants" refers to Secs-1 polypeptides comprising amino acid sequences having one or more amino acid sequence

WO 01/98497

PCT/US00/32479

substitutions, deletions (such as internal deletions and/or Secs-1 polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or Secs-1 fusion polypeptides) as compared to the Secs-1 polypeptide amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 (with or without a leader sequence).

5 Variants may be naturally occurring (e.g., Secs-1 polypeptide allelic variants, Secs-1 polypeptide orthologs, and Secs-1 polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such Secs-1 polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 30, or from 1 to 40, or from 1 to 50, or more than 50 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

15 The term "Secs-1 polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, Secs-1 polypeptide fragments, Secs-1 polypeptide orthologs, or Secs-1 polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified. The term "Secs-1 polypeptide derivatives" also refers to the polypeptides encoded by Secs-1 polypeptide allelic variants or Secs-1 polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

20 The term "mature Secs-1 polypeptide" refers to a Secs-1 polypeptide lacking a leader sequence. A mature Secs-1 polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like. Exemplary mature Secs-1 polypeptides are depicted by the amino acid sequences of SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 6.

25 The term "Secs-1 fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, Secs-1 polypeptide fragments, Secs-1 polypeptide orthologs, Secs-1 polypeptide variants, or

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Secs-1 derivatives, as defined herein. The term "Secs-1 fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by Secs-1 polypeptide allelic variants or Secs-1 polypeptide splice variants, as defined herein.

5 The term "biologically active Secs-1 polypeptides" refers to Secs-1 polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. In addition, a Secs-1 polypeptide may be active as an immunogen; that is, the Secs-1 polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

10 The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

20 The term "identity," as known in the art, refers to a relationship between the sequences of two or more polypeptide molecules or two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecules or polypeptides, as the case may be, as determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer program (*i.e.*, "algorithm").

30 The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity," "similarity" refers to a measure of relatedness which includes both identical matches

WO 01/98497

PCT/US00/32479

and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the same example, there are five more positions where there are conservative substitutions, then the percent identity remains 50%, but the percent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the percent similarity between two polypeptides will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of a Secs-1 polypeptide or Secs-1 nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the Secs-1 polypeptides as set forth herein.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the Secs-1 polypeptide, Secs-1 nucleic acid molecule, or Secs-1 selective binding agent as a pharmaceutical composition.

The term "antigen" refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, and additionally capable of being used in an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more epitopes.

The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for a Secs-1 polypeptide. As used herein, the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human Secs-1 polypeptides and not to bind to human non-Secs-1 polypeptides. It will be

WO 01/98497

PCT/US00/32479

appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat Secs-1 polypeptides.

5 The term "transduction" is used to refer to the transfer of genes from one bacterium to another, usually by a phage. "Transduction" also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been "transfected" when the exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. See, e.g., Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); and Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

15 The term "transformation" as used herein refers to a change in a cell's genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

25 Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared

WO 01/98497

PCT/US00/32479

to the polypeptide in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Such related Secs-1 polypeptides may comprise, for example, an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites or an addition and/or a deletion of one or more cysteine residues.

5 Related nucleic acid molecules also include fragments of Secs-1 nucleic acid molecules which encode a polypeptide of at least about 25 contiguous amino acids, or about 30 amino acids, or about 40 amino acids, or about 50 amino acids, or about 60 amino acids, or about 70 amino acids, or more than 70 amino acid residues of the Secs-1 polypeptide of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

10 In addition, related Secs-1 nucleic acid molecules also include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the Secs-1 nucleic acid molecule of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the
15 amino acid sequence as shown in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the Secs-1 sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of
20 Secs-1 polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

 The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly
25 complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength, and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 65-68°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular*
30 *Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989);

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used – however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, NaDodSO₄, (SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. See Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

Factors affecting the stability of DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/N - 0.72(\%\text{formamide})$$

where N is the length of the duplex formed, [Na⁺] is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, %G+C is the percentage of (guanine+cytosine) bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the melting temperature is reduced by approximately 1^oC for each 1% mismatch.

The term "moderately stringent conditions" refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under "highly stringent conditions" is able to form. Examples of typical "moderately stringent conditions" are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 50-65^oC or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 20% formamide at

WO 01/98497

PCT/US00/32479

37-50°C. By way of example, "moderately stringent conditions" of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between "highly stringent conditions" and "moderately stringent conditions." For example, at 0.015 M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

10 A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl* for oligonucleotide probes up to about 20nt is given by:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C per A-T base pair} + 4^{\circ}\text{C per G-C base pair}$$

*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. See Suggs *et al.*, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown and Fox, eds., 1981).

15 High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the T_m of the oligonucleotide in 6X SSC, 0.1% SDS.

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, or the nucleotide sequences encode a polypeptide that is about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Related nucleic acid molecules encode polypeptides possessing at least one activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

Conservative modifications to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce a polypeptide having functional and chemical characteristics similar to those of Secs-1 polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of Secs-1 polypeptides may be accomplished by selecting substitutions in the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

For example, a "conservative amino acid substitution" may involve a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis."

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues that are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and other reversed or inverted forms of amino acid moieties.

Naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties:

- 1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;
- 3) acidic: Asp, Glu;
- 4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- 6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human Secs-1 polypeptide that are homologous with non-human Secs-1 polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. The hydropathic indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is generally understood in the art (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-31). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functionally equivalent protein or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments, as in the present case. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4);

WO 01/98497

PCT/US00/32479

proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); and tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the Secs-1 polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the Secs-1 polypeptides described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table I.

Table I

Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
Ile	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 using well-known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be changed without destroying biological activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of the Secs-1 molecule that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of a Secs-1 polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a Secs-1 polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of Secs-1 polypeptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of Secs-1 polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays known to those with skill in the art. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See Moult, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a

WO 01/98497

PCT/US00/32479

sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within the structure of a polypeptide or protein. See Holm *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47. It has been suggested that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76).

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "profile analysis" (Bowie *et al.*, 1991, *Science*, 253:164-70; Gribskov *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58), and "evolutionary linkage" (See Holm *et al.*, *supra*, and Brenner *et al.*, *supra*).

Preferred Secs-1 polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites have been altered compared to the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. In one embodiment, Secs-1 polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions that eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred Secs-1 variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (e.g., serine) as compared to the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Cysteine variants are

WO 01/98497

PCT/US00/32479

useful when Secs-1 polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

5 In other embodiments, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 wherein the polypeptide has a carboxyl- and/or amino-terminal truncation and further wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, carboxyl-terminal truncations, and amino-terminal truncations and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other Secs-1 polypeptide, may be fused to a homologous polypeptide to form a homodimer or to a heterologous polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of a Secs-1 fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which

WO 01/98497

PCT/US00/32479

promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other Secs-1 polypeptide.

Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other Secs-1 polypeptide. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other Secs-1 polypeptide, is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31. When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer. *Id.* Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

Table II

Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of	Hodgkin's disease;	U.S. Patent No.

26

WO 01/98497

PCT/US00/32479

	CD30-L	anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatory, transplant rejection	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig Cγ1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the Secs-1 polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of a Secs-1 polypeptide fragment (e.g., the predicted extracellular portion of Secs-1 polypeptide).

The resulting Secs-1 fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides are readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to

WO 01/98497

PCT/US00/32479

those described in *Computational Molecular Biology* (A.M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (D.W. Smith, ed., Academic Press 1993); *Computer Analysis of Sequence Data* (Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin, eds., Humana Press 1994); G. von Heinle, *Sequence*
 5 *Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov and J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073.

Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity
 10 and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:387, Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul
 15 *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, *supra*). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

20 Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of the two sequences, and this small aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full-length sequences. Accordingly, in a preferred embodiment, the selected alignment method (GAP program) will result in an
 25 alignment that spans at least 50 contiguous amino acids of the claimed polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their respective amino acids (the "matched span," as determined by the algorithm). A gap
 30 opening penalty (which is calculated as 3X the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the

WO 01/98497

PCT/US00/32479

"diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 0.1X the gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix is also used by the algorithm (see Dayhoff *et al.*, 5 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supp. 3 1978)(PAM250 comparison matrix); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10915-19 (BLOSUM 62 comparison matrix)).

Preferred parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

10

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-53;

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, *supra*);

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

15

Threshold of Similarity: 0

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

20

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, *supra*;

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

25

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

30

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, and thresholds of similarity may be used, including those set

WO 01/98497

PCT/US00/32479

forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA-to-DNA, protein-to-protein, protein-to-DNA; and additionally, whether the comparison is between given
 5 pairs of sequences (in which case GAP or Bestfit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

Nucleic Acid Molecules

10 The nucleic acid molecules encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or PCR amplification of cDNA.

Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in
 15 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and/or *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). The invention provides for nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining such molecules.

20 Where a gene encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express the Secs-1 polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule
 25 having the sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives obtained from the screening.

30 Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of Secs-1 polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the

WO 01/98497

PCT/US00/32479

detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding an antibody or other binding partner (e.g., receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded Secs-1 polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as *Taq* polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34. These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several

WO 01/98497

PCT/US00/32479

fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of a Secs-1 gene. Usually, the DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the Secs-1 polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of a Secs-1 polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the Secs-1 polypeptide and host cell selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Other useful codon frequency tables include "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," and "Yeast_high.cod."

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding Secs-1 polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations (*see* Sambrook *et al.*, *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation

WO 01/98497

PCT/US00/32479

techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (i.e., the vector is compatible with the host cell machinery such that amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a Secs-1 polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether a Secs-1 polypeptide is to be post-translationally modified (e.g., glycosylated and/or phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, see *Methods Enzym.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid maintenance and for cloning and expression of exogenous nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site, a sequence encoding a leader sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, i.e., an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the Secs-1 polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus), or myc for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the Secs-1 polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently

WO 01/98497

PCT/US00/32479

be removed from the purified Secs-1 polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences which normally function to regulate Secs-1 polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

Flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein – other than the Secs-1 gene flanking sequences – will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the

WO 01/98497

PCT/US00/32479

vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of a Scs-1 polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (e.g., SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV), or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells; (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed. Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection

WO 01/98497

PCT/US00/32479

pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection gene and the DNA that encodes a Secs-1 polypeptide. As a result, increased quantities of Secs-1 polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of a Secs-1 polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (*i.e.*, having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct a Secs-1 polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of a Secs-1 nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of a Secs-1 polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with a Secs-1 nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the Secs-1 nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of a Secs-1 polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted Secs-1 polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of a Secs-1 nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native Secs-1 polypeptide signal sequence joined to a Secs-1 polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to a Secs-1 polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, *i.e.*, cleaved by a

WO 01/98497

PCT/US00/32479

signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native Secs-1 polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native Secs-1 polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add pro-sequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression, which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the amino-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired Secs-1 polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the Secs-1 gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the Secs-1 gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when a Secs-1 cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (*i.e.*, 5' or 3') of the cDNA such that

WO 01/98497

PCT/US00/32479

it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host cell into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one
5 intron may be used in the vector.

The expression and cloning vectors of the present invention will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the Secs-1 polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (*i.e.*, 5') to the start codon of a structural gene (generally within
10 about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive
15 promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding Secs-1 polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the
20 desired promoter sequence into the vector. The native Secs-1 promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of a Secs-1 nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for
25 use.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase; a tryptophan (trp) promoter system; and hybrid promoters such as the tac promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling
30 one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence, using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling Secs-I gene expression include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bennoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); the regulatory sequences of the metallothionein gene (Briuster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Komaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); the alpha-feto-protein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); the

WO 01/98497

PCT/US00/32479

alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); the myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

10 An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding a Secs-1 polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (e.g., globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to a Secs-1 nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the flanking sequences described herein are not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors for practicing this invention are those which are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech,

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Pub. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to plasmids such as Bluescript[®] plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid, Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (e.g., TOPO[™] TA Cloning[®] Kit, PCR2.1[®] plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), and mammalian, yeast or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives, Clontech, Palo Alto, CA).

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding a Secs-1 polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for a Secs-1 polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook *et al.*, *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under appropriate conditions, synthesizes a Secs-1 polypeptide which can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urdaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 5 97:4216-20), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 and COS-7 cell lines, and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate 10 cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A 15 cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (e.g., HB101, DH5 α , DH10, and 20 MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for the expression of the polypeptides of the present invention. 25 Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described, for example, in Kitts *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14:810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 30 4:564-72; and Lucklow *et al.*, 1993, *J. Virol.*, 67:4566-79. Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen).

WO 01/98497

PCT/US00/32479

One may also use transgenic animals to express glycosylated Secs-1 polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce Secs-1 polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

Polypeptide Production

Host cells comprising a Secs-1 polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transfected or transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of a Secs-1 polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel

WO 01/98497

PCT/US00/32479

electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If a Secs-1 polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, 5 the Secs-1 polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

For a Secs-1 polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular 10 material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication followed by centrifugation.

15 If a Secs-1 polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence 20 of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized Secs-1 polypeptide can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the Secs-1 polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described 25 herein and in Marston *et al.*, 1990, *Math. Enz.*, 182:264-75.

In some cases, a Secs-1 polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually 30 above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body

WO 01/98497

PCT/US00/32479

solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine bridges. Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiobis GSH, cupric chloride, dithiodureitol (DTT)/dithiane DTT, and 2-2-mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). In many instances, a cosolvent may be used or may be needed to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of a Secs-1 polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

The purification of a Secs-1 polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (Secs-1 polypeptide/hexahis) or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) at either its carboxyl- or amino-terminus, it may be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel. Thus, an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification of Secs-1 polypeptide/polyHis. See, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993).

Additionally, Secs-1 polypeptides may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to a Secs-1 polypeptide.

Other suitable procedures for purification include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange chromatography, molecular sieve chromatography, HPLC, electrophoresis (including native gel electrophoresis) followed by gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased purity.

Secs-1 polypeptides may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 82:5132; and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Such polypeptides may be synthesized with or without a methionine on the amino-terminus. Chemically synthesized Secs-1 polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized Secs-1 polypeptides are expected to have comparable biological activity to the corresponding Secs-1 polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural Secs-1 polypeptide.

Another means of obtaining Secs-1 polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the Secs-1 polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for protein purification as described herein. The presence of the Secs-1 polypeptide during purification may be monitored, for example, using an antibody prepared against recombinantly produced Secs-1 polypeptide or peptide fragments thereof.

A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for Secs-1 polypeptide. See, e.g., Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. See also, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73. Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods for obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific

WO 01/98497

PCT/US00/32479

biological function. The procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those that exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

U.S. Patent Nos. 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having the desired activity.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT/US98/20094 (WO99/15650) filed by Athorasy, Inc. Known as "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can also be used to create comprehensive Scos-1 polypeptide expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (*e.g.*, plant, mouse, etc.).

Synthesis

It will be appreciated by those skilled in the art that the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

5 Selective Binding Agents

The term "selective binding agent" refers to a molecule that has specificity for one or more Secs-1 polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary Secs-1 polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the Secs-1 polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to a Secs-1 polypeptide receptor.

Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind Secs-1 polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal including monospecific polyclonal; monoclonal (MAbs); recombinant; chimeric; humanized, such as CDR-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an epitope on the Secs-1 polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward a Secs-1 polypeptide generally are produced in animals (e.g., rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of Secs-1 polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate a Secs-1 polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-Secs-1 antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward Secs-1 polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, 1975, 5 *Nature* 256:495-97 and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with Secs-1 polypeptides.

10 Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy (H) and/or light (L) chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is/are identical with 15 or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55.

20 In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. See U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using 25 methods described in the art (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25; Ricchmann *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region (CDR) for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind Secs-1 30 polypeptides. Using transgenic animals (e.g., mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin

WO 01/98497

PCT/US00/32479

production such antibodies are produced by immunization with a Secs-I polypeptide antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in*
5 *Immunol.* 7:33. In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals, that is those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all
10 of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, *e.g.*, murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these antigens. See PCT App. Nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, PCT App. Nos.
15 PCT/US91/245 and PCT/GB89/01207, and in European Patent Nos. 546073B1 and 546073A1. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can also be produced from
20 phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). These processes mimic immune selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in PCT App. No. PCT/US98/17364, which describes the
25 isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk-receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a
30 preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (*e.g.*, human) antibodies may be produced by the expression

of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-Secs-1 antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of Secs-1 polypeptides. The antibodies will bind Secs-1 polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-Secs-1 antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one that is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In , or ^{67}Ga ; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase, β -galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer, *et al.*, 1990, *Methods Enz.* 184:138-63).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (e.g., a Secs-1 polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an Secs-1 polypeptide) for binding with a limited amount of anti-Secs-1 antibody. The amount of a Secs-1 polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. See, e.g., U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a

WO 01/98497

PCT/US00/32479

detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

5 The selective binding agents, including anti-Secs-1 antibodies, are also useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host assayed. The antibody may be labeled with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic
10 resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a Secs-1 polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the
15 invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to a Secs-1 polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of a Secs-1 polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the selective binding agent, *e.g.*, an antagonist antibody, will inhibit the functional activity of a Secs-1 polypeptide by at least about 50%, and
20 preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an anti-Secs-1 polypeptide antibody that is capable of interacting with a Secs-1 polypeptide binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating Secs-1 polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-Secs-1 polypeptide antibodies, are identified by
25 screening assays that are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising Secs-1 selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting Secs-1 polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.
30

Microarrays

WO 01/98497

PCT/US00/32479

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high-density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array contains numerous copies of a single nucleic acid species that acts as a target for hybridization with a complementary nucleic acid sequence (e.g., mRNA). In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA that is specifically bound to each target nucleic acid molecule. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the Secs-1 molecules of the invention, including, but not limited to: the identification and validation of Secs-1 disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of related Secs-1 molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical trials; and enhancing related Secs-1 polypeptide small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens.

Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of Secs-1 polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures described herein. Secs-1 polypeptide derivatives are modified in a manner that is different – either in the type or location of the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other Secs-1 polypeptide, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an

WO 01/98497

PCT/US00/32479

aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or
 5 unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2 kDa to about 100 kDa (the term "about" indicating that in preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably
 10 between about 12 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins,
 15 including mono-(C₁-C₁₀), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), and
 20 polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional crosslinking molecules which may be used to prepare covalently attached Secs-1 polypeptide multimers.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for
 25 preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps of: (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other Secs-1 polypeptide, becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal reaction conditions
 30 will be determined based on known parameters and the desired result. For example,

WO 01/98497

PCT/US00/32479

the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the Secs-1 polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino-terminus. See, e.g., U.S. Patent No. 5,234,784.

5 The pegylation of a polypeptide may be specifically carried out using any of the pegylation reactions known in the art. Such reactions are described, for example, in the following references: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3:4-10; European Patent Nos. 0154316 and 0401384; and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation
10 reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, a selected polymer should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, a selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono
15 C₁-C₁₀ alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, Secs-1 polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/Secs-1 polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/Secs-1 polypeptide molecules. Secs-1 polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or
20 trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

Generally, conditions that may be alleviated or modulated by the administration of the present Secs-1 polypeptide derivatives include those described herein for Secs-1 polypeptides. However, the Secs-1 polypeptide derivatives
25 disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

Genetically Engineered Non-Human Animals

30 Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other

WO 01/98497

PCT/US00/32479

farm animals, in which the genes encoding native Secs-1 polypeptide have been disrupted (*i.e.*, "knocked out") such that the level of expression of Secs-1 polypeptide is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent

5 No. 5,557,032.

The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of a Secs-1 gene for that animal or a heterologous Secs-1 gene is over-expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic

10 animals may be prepared using well known methods such as those described in U.S. Patent No 5,489,743 and PCT Pub. No. WO 94/28122.

The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the Secs-1 polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (*e.g.*, by using homologous recombination methods) to

15 alter the level of expression of one or more of the native Secs-1 polypeptides.

These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the Secs-1 gene. In certain embodiments, the amount of Secs-1 polypeptide that is produced

20 may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, over-expression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its

25 ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

30

Assaying for Other Modulators of Secs-1 Polypeptide Activity

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of Secs-1 polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate Secs-1 polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules
5 may be administered either in an *ex vivo* manner or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device, or the like.

"Test molecule" refers to a molecule that is under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of a Secs-1 polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with a Secs-1 polypeptide.
10 However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate Secs-1 polypeptide activity indirectly, such as by affecting Secs-1 gene expression, or by binding to a Secs-1 polypeptide binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to a Secs-1 polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.
15

Methods for identifying compounds that interact with Secs-1 polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, a Secs-1 polypeptide is incubated with a test molecule under conditions that permit the interaction of the test molecule with a Secs-1 polypeptide, and the extent of the
20 interaction is measured. The test molecule can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture.

In certain embodiments, a Secs-1 polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule that interacts with Secs-1 polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate
25 Secs-1 polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding a Secs-1 polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of Secs-1 polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

Once a test molecule has been identified as interacting with a Secs-1
30 polypeptide, the molecule may be further evaluated for its ability to increase or decrease Secs-1 polypeptide activity. The measurement of the interaction of a test

WO 01/98497

PCT/US00/32479

molecule with Secs-1 polypeptide may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays, and immunoassays. In general, a test molecule is incubated with a Secs-1 polypeptide for a specified period of time, and Secs-1 polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with Secs-1 polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay. Alternatively, modified forms of Secs-1 polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.

In the event that Secs-1 polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (e.g., a receptor or a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of a Secs-1 polypeptide to the corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor, or ligand). These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of a Secs-1 polypeptide to its binding partner. In one assay, a Secs-1 polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled Secs-1 polypeptide binding partner (for example, iodinated Secs-1 polypeptide binding partner) and a test molecule can then be added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted for radioactivity, using a scintillation counter, to determine the extent to which the binding partner bound to the Secs-1 polypeptide. Typically, a molecule will be tested over a range of concentrations, and a series of control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, *i.e.*, immobilizing Secs-1 polypeptide binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled Secs-1 polypeptide, and determining the extent of Secs-1 polypeptide binding. See, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology*, chap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995).

As an alternative to radiolabeling, a Secs-1 polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin, and the presence of biotinylated protein can then be

WO 01/98497

PCT/US00/32479

detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horse radish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), which can be detected colorimetrically, or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to a Secs-1 polypeptide or to a Secs-1 polypeptide binding partner, and which is conjugated to biotin, may also
5 be used for purposes of detection following incubation of the complex with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

A Secs-1 polypeptide or a Secs-1 polypeptide binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads, or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a
10 solution containing the complementary protein and the test compound. After incubation, the beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between a Secs-1 polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column with the test molecule and complementary protein passing
15 through the column. The formation of a complex between a Secs-1 polypeptide and its binding partner can then be assessed using any of the techniques described herein (e.g., radiolabelling or antibody binding).

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule which increases or decreases the formation of a complex between a Secs-1 polypeptide
20 binding protein and a Secs-1 polypeptide binding partner is a surface plasmon resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system is utilized as specified by the manufacturer. This assay essentially involves the covalent binding of either Secs-1 polypeptide or a Secs-1 polypeptide binding partner to a dextran-coated sensor chip that is located in
25 a detector. The test compound and the other complementary protein can then be injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass that is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip, with the change in molecular mass being measured by
30 the detector system.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between a Secs-1 polypeptide and a Secs-1 polypeptide binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneously with, or subsequent to, the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for an effect on the formation of a complex between a Secs-1 polypeptide and Secs-1 polypeptide binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between a Secs-1 polypeptide and a Secs-1 polypeptide binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either Secs-1 polypeptide or Secs-1 polypeptide binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine, or rodent sources. The binding of a Secs-1 polypeptide to cells expressing Secs-1 polypeptide binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to a Secs-1 polypeptide binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the Secs-1 gene. In certain embodiments, the amount of Secs-1 polypeptide or a Secs-1 polypeptide fragment that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the over-expression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other

WO 01/98497

PCT/US00/32479

examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

5

Internalizing Proteins

The *tat* protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. See, e.g., Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:664-68. For example, an 11 amino acid sequence (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 12) of the HIV *tat* protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. See Schwarz *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 13), which
10 of the HIV *tat* protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. See Schwarz *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 13), which
15 penetrate tissues following intraperitoneal administration, are prepared, and the binding of such constructs to cells is detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Cells treated with a *tat*- β -gal fusion protein will demonstrate β -gal activity. Following injection, expression of such a construct can be detected in a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue. It is believed that such constructs undergo some degree of unfolding in order to enter the cell, and as such, may require a refolding following entry into the cell.
20

It will thus be appreciated that the *tat* protein sequence may be used to internalize a desired polypeptide into a cell. For example, using the *tat* protein sequence, a Secs-1 antagonist (such as an anti-Secs-1 selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of a Secs-1 molecule. As used herein, the term "Secs-1 molecule" refers to both Secs-1 nucleic acid molecules and Secs-1 polypeptides as defined herein. Where desired, the Secs-1 protein itself may also be internally administered to a cell using these procedures. See also, Straus, 1999,
25
30 *Science* 285:1466-67.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Cell Source Identification Using Secs-1 Polypeptide

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with a Secs-1 polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In certain
5 embodiments, nucleic acids encoding a Secs-1 polypeptide can be used as a probe to identify cells described herein by screening the nucleic acids of the cells with such a probe. In other embodiments, one may use anti-Secs-1 polypeptide antibodies to test for the presence of Secs-1 polypeptide in cells, and thus, determine if such cells are
10 of the types described herein.

Secs-1 Polypeptide Compositions and Administration

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such SECS-1 polypeptide pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically
15 effective amount of a Secs-1 polypeptide or a Secs-1 nucleic acid molecule in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more Secs-1 polypeptide selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or
20 physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

The pharmaceutical composition may contain formulation materials for
25 modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolality, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl,
30 citric acids, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or

WO 01/98497

PCT/US00/32479

glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or wetting agents (such as phorones; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapol), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides – preferably sodium or potassium chloride – or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. See *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990).

The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery format, and desired dosage. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the Secs-1 molecule.

The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for injection may be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present

WO 01/98497

PCT/US00/32479

invention, Secs-1 polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the Secs-1 polypeptide product
5 may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The Secs-1 polypeptide pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

10 The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range of from about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic
15 compositions for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable, aqueous solution comprising the desired Secs-1 molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which a Secs-1 molecule is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve
20 the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting
25 sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, Secs-1 polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. Secs-1 polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may
30 also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further

WO 01/98497

PCT/US00/32479

described in PCT Pub. No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, Secs-1 polypeptides that are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the Secs-1 polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of Secs-1 polypeptides in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

Additional Secs-1 polypeptide pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving Secs-1 polypeptides in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bio-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. See, e.g., PCT/US93/00829, which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, e.g. films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919 and European Patent No. 058481),

WO 01/98497

PCT/US00/32479

copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-56), poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid
 5 (European Patent No. 133988). Sustained-release compositions may also include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. See, e.g., Epstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92; and European Patent Nos. 036676, 088046, and 143949.

The Secs-I pharmaceutical composition to be used for *in vivo* administration
 10 typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are
 15 placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form
 20 or in a form (e.g., lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing
 25 single and multi-chambered pre-filled syringes (e.g., liquid syringes and lyosyringes).

The effective amount of a Secs-I pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels
 30 for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the Secs-I molecule is being used, the route of administration,

WO 01/98497

PCT/US00/32479

and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titrate the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 $\mu\text{g/kg}$ to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1 $\mu\text{g/kg}$ up to about 100 mg/kg ; or 1 $\mu\text{g/kg}$ up to about 100 mg/kg ; or 5 $\mu\text{g/kg}$ up to about 100 mg/kg .

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the Secs-1 molecule in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, *e.g.*, orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

In some cases, it may be desirable to use Secs-1 polypeptide pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to Secs-1 polypeptide

pharmaceutical compositions after which the cells, tissues, or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, a Secs-1 polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described
5 herein, to express and secrete the Secs-1 polypeptide. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogeneic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric
10 enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

As discussed herein, it may be desirable to treat isolated cell populations (such as stem cells, lymphocytes, red blood cells, chondrocytes, neurons, and the
15 like) with one or more Secs-1 polypeptides. This can be accomplished by exposing the isolated cells to the polypeptide directly, where it is in a form that is permeable to the cell membrane.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (e.g., homologous recombination and/or other recombinant production methods) for
20 both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally-silent Secs-1 gene, or an under-expressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of Secs-1
25 polypeptides.

Homologous recombination is a technique originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the
30 mammalian genome (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44:419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

WO 01/98497

PCT/US00/32479

85:8583-87) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330:576-78). Exemplary homologous recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505500; PCT/US90/07642, and PCT Pub No. WO 91/09955).

5 Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in
10 contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated
15 into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA that may interact with or control the expression of a Secs-1 polypeptide, *e.g.*, flanking
20 sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired Secs-1 polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression
25 of the desired Secs-1 polypeptide may be achieved not by transfection of DNA that encodes the Secs-1 gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of a Secs-1 gene.

30 In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination

WO 01/98497

PCT/US00/32479

into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA which includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon, and the splice donor site present in the DNA construct are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, Secs-1 polypeptide production from a cell's endogenous Secs-1 gene involves first using homologous recombination to place a recombination sequence from a site-specific recombination system (e.g., Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) upstream of (i.e., 5' to) the cell's endogenous genomic Secs-1 polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic Secs-1 polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic Secs-1 polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251:1351-55). Any flanking sequences known to increase transcription (e.g., enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as

WO 01/98497

PCT/US00/32479

to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased Secs-1 polypeptide production from the cell's endogenous Secs-1 gene.

A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic Secs-1 polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, and translocation) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased Secs-1 polypeptide production from the cell's endogenous Secs-1 gene.

An additional approach for increasing, or causing, the expression of Secs-1 polypeptide from a cell's endogenous Secs-1 gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (e.g., transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (e.g., transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased Secs-1 polypeptide production from the cell's endogenous Secs-1 gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (e.g., a polypeptide comprising a site specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased Secs-1 polypeptide production from the cell's endogenous Secs-1 gene results.

The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a) - (d) into a target gene in a cell such that the elements (b) - (d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a) - (f) such that the elements of (b) - (f) are operatively

linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the presclected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

5 If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of Secs-1 polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon
10 insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding a Secs-1 polypeptide, which
15 nucleotides may be used as targeting sequences.

Secs-1 polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing Secs-1 polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of Secs-1 polypeptide. Such Secs-1 polypeptide-producing cells can be cells that are natural
20 producers of Secs-1 polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce Secs-1 polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired Secs-1 polypeptide or with a gene augmenting the expression of Secs-1 polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and
25 secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered a Secs-1 polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing Secs-1 polypeptide be of human origin and produce human Secs-1 polypeptide. Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing Secs-1 polypeptide be
30 transformed with an expression vector containing a gene encoding a human Secs-1 polypeptide.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of Secs-1 polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue. Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce Secs-1 polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Bactge *et al.* (PCT Pub. No. WO 95/05452 and PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters that are not subject to down-regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, see U.S. Patent Nos. 4,892,538; 5,011,472; and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in PCT Pub. No. WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). See also, PCT Pub. No. WO 91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29; Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75; and Tresco *et al.*, 1992, *ASAIO* 38:17-23.

In vivo and *in vitro* gene therapy delivery of Secs-1 polypeptides is also envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the Secs-1 gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA) encoding a Secs-1 polypeptide which may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct." The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous Secs-1 gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include DNA molecules designed for site-specific integration (e.g., endogenous sequences useful for homologous recombination),

WO 01/98497

PCT/US00/32479

tissue-specific promoters, enhancers or silencers, DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as fabcis to identify transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, transcription
5 factors enhancing expression from a vector, and factors enabling vector production.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex vivo* or *in vivo*) using viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the
10 chromosomal DNA of the cells, and the gene can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the Secs-1 gene in the target cell. Such elements are turned
15 on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs to dimerize chimeric proteins which contain a small molecule-binding domain and a domain capable of initiating a biological process, such as a DNA-binding protein or transcriptional activation protein (see
20 PCT Pub. Nos. WO 96/41865, WO 97/31898, and WO 97/31899). The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional
25 aggregation domain that results in the retention of the aggregated protein in the endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (e.g., small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the
30 cell. See Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287:816-17 and Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287:826-30.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the systems described herein. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors that then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. Patent No. 5,364,791 and PCT Pub. Nos. WO 96/40911 and WO 97/10337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone) which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain, DNA-binding domain, and ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No. 5,514,578 and PCT Pub. Nos. WO 97/38117, WO 96/37609, and WO 93/03162.

Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, *i.e.*, it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758, 5,650,298, and 5,634,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Inovir Laboratories Inc.

In vivo gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding Secs-1 polypeptide into cells via local injection of a Secs-1 nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefti, 1994, *Neurobiology* 25:1418-35. For example, a nucleic acid molecule encoding a Secs-1 polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the targeted cells (*see, e.g.*, Johnson, PCT Pub. No. WO 95/34670; PCT App. No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome typically contains AAV inverted

WO 01/98497

PCT/US00/32479

terminal repeats flanking a DNA sequence encoding a Secs-1 polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells which have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236 (involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (*e.g.*, gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 4,970,154 (involving electroporation techniques), 5,679,559 (describing a lipoprotein-containing system for gene delivery), 5,676,954 (involving liposome carriers), 5,593,875 (describing methods for calcium phosphate transfection), and 4,945,050 (describing a process wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells), and PCT Pub. No. WO 96/40958 (involving nuclear ligands).

WO 01/98497

PCT/US00/32479

It is also contemplated that Secs-1 gene therapy or cell therapy can further include the delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

A means to increase endogenous Secs-1 polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the Secs-1 polypeptide promoter, where the enhancer elements can serve to increase transcriptional activity of the Secs-1 gene. The enhancer elements used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene -- enhancer elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding a Secs-1 polypeptide is to be "turned on" in T-cells, the *lec* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the Secs-1 polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequences) using standard cloning techniques. This construct, known as a "homologous recombination construct," can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy also can be used to decrease Secs-1 polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter. Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the Secs-1 gene selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example, the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding Secs-1 gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the Secs-1 polypeptide promoter (from the same or a related species as the Secs-1

WO 01/98497

PCT/US00/32479

gene to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

Therapeutic Uses

Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including those recited herein.

Secs-1 polypeptide agonists and antagonists include those molecules which regulate Secs-1 polypeptide activity and either increase or decrease at least one activity of the mature form of the Secs-1 polypeptide. Agonists or antagonists may be co-factors, such as a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule, which interact with Secs-1 polypeptide and thereby regulate its activity. Potential polypeptide agonists or antagonists include antibodies that react with either soluble or membrane-bound forms of Secs-1 polypeptides that comprise part or all of the extracellular domains of the said proteins. Molecules that regulate Secs-1 polypeptide expression typically include nucleic acids encoding Secs-1 polypeptide that can act as anti-sense regulators of expression.

The Secs-1 gene is primarily expressed in the gastrointestinal tract, as determined by *in situ* hybridization. Based on this expression pattern, Secs-1 polypeptides may play a role in gastrointestinal development and function. Accordingly, Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and

WO 01/98497

PCT/US00/32479

antagonists thereof (including, but not limited to, anti-Secs-1 selective binding agents) may be useful in the diagnosis and/or treatment of diseases involving the gastrointestinal tract. Examples of such diseases include, but are not limited to, gastrointestinal ulcers, reflux esophagitis, coeliac disease, diabetes, ischemia-reperfusion injury, Crohn's disease, inflammatory bowel disease, and bacterial and viral-induced infections and colitis. In addition, Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof may be useful in the treatment of chemotherapy or radiation-induced gastrointestinal damage. Other diseases associated with gastrointestinal development and function are encompassed by the scope of this invention.

Based on the expression of the Secs-1 gene in the gastrointestinal tract, Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, agonists and antagonists thereof (including, but not limited to, anti-Secs-1 selective binding agents) may also be useful for the diagnosis and/or treatment of diseases involving digestion or metabolism. Examples of such diseases include, but are not limited to, obesity, gastrointestinal reflux, diverticulitis, diverticulosis, enteritis, and dysphagia. Other such metabolic disorders are encompassed by the scope of this invention.

Since Secs-1 polypeptide expression has been detected in the tongue and oral mucosa, Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, agonists and antagonists thereof (including, but not limited to, anti-Secs-1 selective binding agents) may also be useful for the diagnosis and/or treatment of diseases associated with the oral cavity. Examples of such diseases include, but are not limited to, periodontal disease, oral cancer, and chemotherapy or radiation-induced mucositis. Other diseases associated with the oral cavity are encompassed by the scope of this invention.

The differential expression of Secs-1 polypeptides in tumor cells and normal cells suggests that Secs-1 polypeptides may play a role in metastatic disease. Accordingly, Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, agonists and antagonists thereof (including, but not limited to, anti-Secs-1 selective binding agents) may play a role in the diagnosis and/or treatment of cancer. Examples of such diseases include, but are not limited to, cancer of the colon, stomach, throat, esophagus,

WO 01/98497

PCT/US00/32479

breast, prostate, uterus, testis, or lung. Other cancers and metastatic diseases are encompassed by the scope of this invention.

5 Significant levels of Secs-1 polypeptide expression were also detected in the testis and uterus. Therefore, Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, agonists and antagonists thereof (including, but not limited to, anti-Secs-1 selective binding agents) may play a role in the diagnosis and/or treatment of fertility disorders. Examples of such diseases include, but are not limited to, male infertility, fertility enhancement, endometriosis, fibroid, or menstruation. Other disorders associated with fertility are encompassed by the scope of this invention.

10 Increased levels of Secs-1 polypeptide expression were also detected in psoriasis and wound healing models. Therefore, Secs-1 nucleic acid molecules, polypeptides, agonists and antagonists thereof (including, but not limited to, anti-Secs-1 selective binding agents) may play a role in the diagnosis and/or treatment of psoriasis and wound healing. Other disorders associated with the skin are encompassed by the scope of this invention.

15 Agonists or antagonists of Secs-1 polypeptide function may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the condition being treated.

20 Other diseases caused by or mediated by undesirable levels of Secs-1 polypeptides are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive levels of Secs-1 polypeptides and sub-normal levels of Secs-1 polypeptides.

25 Uses of Secs-1 Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the invention (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be used to map the locations of the Secs-1 gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

30 Secs-1 nucleic acid molecules (including those that do not themselves encode

WO 01/98497

PCT/US00/32479

biologically active polypeptides), may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of a Secs-1 nucleic acid molecule in mammalian tissue or bodily fluid samples.

Other methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more Secs-1 polypeptides. Such inhibition may be effected by nucleic acid molecules that are complementary to and hybridize to expression control sequences (triple helix formation) or to Secs-1 mRNA. For example, antisense DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of a Secs-1 gene can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of the Secs-1 gene disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5' end) of each selected Secs-1 gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding Secs-1 mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of a Secs-1 polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative inhibitor of one or more Secs-1 polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected Secs-1 polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

In addition, a Secs-1 polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to a Secs-1 polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of Secs-1 polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent, treat, or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited herein. The antibodies may bind to a Secs-1 polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of a Secs-1 polypeptide, or may bind to a

WO 01/98497

PCT/US00/32479

polypeptide to increase at least one activity characteristic of a Secs-1 polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the Secs-1 polypeptide).

The Secs-1 polypeptides of the present invention can be used to clone Secs-1 polypeptide receptors, using an expression cloning strategy. Radiolabeled (¹²⁵Iodine) Secs-1 polypeptide or affinity/activity-tagged Secs-1 polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be used in binding assays to identify a cell type or cell line or tissue that expresses Secs-1 polypeptide receptors. RNA isolated from such cells or tissues can be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (such as COS or 293 cells) to create an expression library. A radiolabeled or tagged Secs-1 polypeptide can then be used as an affinity ligand to identify and isolate from this library the subset of cells that express the Secs-1 polypeptide receptors on their surface. DNA can then be isolated from these cells and transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing Secs-1 polypeptide receptors is many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant clone containing a Secs-1 polypeptide receptor is isolated. Isolation of the Secs-1 polypeptide receptors is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the Secs-1 polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble Secs-1 polypeptide receptors, anti-Secs-1 polypeptide receptor antibodies, small molecules, or antisense oligonucleotides, and they may be used for treating, preventing, or diagnosing one or more of the diseases or disorders described herein.

Deposits of cDNA encoding murine Secs-1 polypeptide and human Secs-1 polypeptide, subcloned into pSPORT1 (Gibco-BRL) and p7173D (Pharmacia), and having Accession Nos. PTA-1753 and PTA-1755, were made with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on April 25, 2000.

The following examples are intended for illustration purposes only, and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Example 1: Cloning of the Human and Murine Secs-1 Polypeptide Genes

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze the genes encoding human and murine Secs-1 polypeptides.

5 Using a proteomic-based approach, a novel peptide was identified from conditioned media obtained from squamous cell and colorectal carcinoma cell lines. The approach utilized in identifying this peptide suggests that it is a naturally secreted product. The amino acid sequence of the identified peptide was determined and found to share sequence identity with EST sequences present in both GenBank and proprietary (Amgen dbEST) databases. Specifically, the amino acid sequence of
10 this novel secreted peptide was found to share homology with an amino acid sequence corresponding to a human EST sequence present in the GenBank database (GenBank accession no. AA283751). The cDNA clone corresponding to this EST sequence was obtained from the Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression (I.M.A.G.E.) Consortium (I.M.A.G.E. Consortium clone no. 713624). The nucleotide sequence of this cDNA clone was determined and was
15 found to contain the complete coding sequence for the human Secs-1 gene.

Sequence analysis of the full-length cDNA for human Secs-1 polypeptide indicated that the gene comprises a 243 bp open reading frame encoding a protein of
20 81 amino acids and possessing a potential signal peptide of 24 amino acids in length at its amino terminus (Figure 2; predicted signal peptide indicated by underline). Figure 2 illustrates the nucleotide sequence of the human Secs-1 nucleic acid sequence and the deduced amino acid sequence of the human Secs-1 polypeptide. The human Secs-1 polypeptide was found to be glycosylated at position 51 (Asp).

25 Sequences corresponding to the murine Secs-1 gene were identified in proprietary databases derived from AC-6 stromal and colon crypt cDNA libraries. Murine Secs-1 polypeptide cDNA sequences were isolated as follows. Total RNA was prepared from either the AC-6 stromal cell line or colon crypt tissue using the TRIzol® method (Gibco-BRL, Rockville, MD), mRNA isolated from total RNA
30 using a Dynabeads mRNA kit (Dynal, Lake Success, NY), and cDNA synthesized from the isolated mRNA using the SuperScript™ System (Gibco-BRL) and a Not I

WO 01/98497

PCT/US00/32479

oligo d(T) primer (Gibco-BRL). Following cDNA synthesis, Sal I adapters (Gibco-BRL) were ligated onto the cDNA, the cDNA was digested with Not I, and the digested cDNA was then size selected on an agarose gel. Inserts of approximately 1.0 kb or more in size were isolated and ligated into the pSPORT (Gibco-BRL) vector. Ligation products were transformed into DH10B competent cells and the nucleotide sequence of selected clones was then analyzed.

Sequence analysis of the full-length cDNA for murine Secs-1 polypeptide indicated that the gene comprises a 234 bp open reading frame encoding a protein of 78 amino acids and possessing a potential signal peptide of 24 amino acids in length at its amino terminus (Figure 1; predicted signal peptide indicated by underline). Figure 1 illustrates the nucleotide sequence of the murine Secs-1 nucleic acid sequence and the deduced amino acid sequence of the murine Secs-1 polypeptide.

In addition to identifying a number of homologous sequences in GenBank and proprietary databases, the human and murine Secs-1 nucleic acid sequences were found to share sequence homology with a previously reported rat EST sequence (Hennigan *et al.*, 1994, *Ocogene* 9:3591-600). However, Hennigan *et al.* disclosed only a portion of the rat Secs-1 nucleic acid sequence and did not disclose the open reading frame for the rat Secs-1 ortholog. Figure 3 illustrates the amino acid sequence alignment of the full-length rat Secs-1 polypeptide, murine Secs-1 polypeptide, and human Secs-1 polypeptide. A FASTA search of the SwissProt database using the predicted amino acid sequences for both human and murine Secs-1 polypeptide failed to identify any other sequences sharing significant homology.

Figures 4A-4F illustrate the genomic nucleotide sequence for human Secs-1 polypeptide. The genomic sequence for human Secs-1 polypeptide was determined by analysis of a publicly available BAC clone (GenBank accession no. AC022389). The location and deduced amino acid sequence of the exons are indicated (Figures 4A, 4D, and 4F).

Example 2: Secs-1 mRNA Expression

Multiple human tissue northern blots (either proprietary or obtained from BioSource, Hayward, CA or Clontech, Palo Alto, CA) were probed with a ³²P-dCTP

WO 01/98497

PCT/US00/32479

labeled, 542 bp human Secs-1 PCR fragment. The human Secs-1 PCR probe was prepared using 25 ng of Jurkat cell cDNA, amplimers corresponding to the human Secs-1 gene (5'-C-C-C-A-A-C-T-C-A-A-C-A-A-C-G-T-G-A-A-3'; SEQ ID NO: 14 and 5'-G-G-G-A-C-C-A-C-T-G-G-A-T-G-C-T-G-3'; SEQ ID NO: 15) at a final concentration of 0.2 μ M each, 2.5 units of Taq polymerase, 200 μ M dNTPs, 50 μ Ci ^{32} P-dCTP, and 1X Taq polymerase buffer, in a total reaction volume of 25 μ l. Reactions were performed at 94°C for 2 minutes for one cycle; 94°C for 20 seconds, 57.8°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 40 cycles; and 72°C for 5 minutes for 1 cycle.

10 Northern blots were prehybridized for 1 hour at 42°C in ULTRAhyb™ (Ambion, Austin, TX), and then were hybridized at 42°C overnight in fresh hybridization buffer containing approximately 8×10^4 cpm/ μ l of the labeled probe. Following hybridization, the filters were washed twice for 30 minutes at 50°C in 2X SSPE and 0.5% SDS, and then twice for 15 minutes at room temperature in 0.1X
15 SSPE and 0.5% SDS. The blots were then analyzed using a phosphorimager.

Analysis of the Northern blots indicated that a single transcript having a molecular mass of 1 kb was expressed in colon and prostate tissue. The expression of Secs-1 mRNA in normal colon was found to be four fold higher than that in colon tumor, and the expression of Secs-1 mRNA in normal prostate tissue was found to be
20 higher than that in prostate tumor.

The expression of Secs-1 mRNA was localized by *in situ* hybridization. A panel of normal embryonic and adult mouse tissues was fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Sectioned tissues
25 were permeabilized in 0.2 M HCl, digested with Proteinase K, and acetylated with triethanolamine and acetic anhydride. Sections were prehybridized for 1 hour at 60°C in 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 10 mM DTT, 0.25 mg/ml tRNA, 25 μ g/ml polyA, 25 μ g/ml polyC and 50% formamide and then hybridized overnight at 60°C in the same buffer
30 containing 10% dextran and 2×10^4 cpm/ μ l of a ^{32} P-labeled, 291 bp antisense riboprobe complementary to the murine Secs-1 gene.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

The riboprobe was obtained by *in vitro* transcription of a clone containing murine Secs-1 cDNA sequences. A murine Secs-1 cDNA sequence was generated by RT-PCR using 100 µg of total RNA from MSC 2.2.2 cells, amplimers corresponding to the murine Secs-1 gene (5'-A-C-T-C-C-G-G-C-T-C-C-T-T-C-A-C-T-A-T-G-A-3'; SEQ ID NO: 16 and 5'-A-T-G-T-G-G-G-C-A-T-C-A-T-C-A-A-C-G-C-T-T-T-A-3'; SEQ ID NO: 17) at a final concentration of 0.2 µM each, 5 units of Taq polymerase, 200 µM dNTPs, and 1X Taq polymerase buffer, in a total reaction volume of 50 µl. Reactions were performed at 94°C for 2 minutes for one cycle; 94°C for 20 seconds and 57°C for 30 seconds for 40 cycles; and 72°C for 5 minutes for 1 cycle. Following amplification, PCR products were separated on an agarose gel, excised from the gel, purified using the QIAQuick Gel Extraction kit (Qiagen, Valencia, CA), and ligated into the pGEM-T (Promega, Madison, WI) vector. Ligation products were transformed into DH5-α competent cells and six clones selected for analysis by restriction enzyme digestion and sequencing.

Following hybridization, sections were rinsed in buffer, treated with RNaseA to digest unhybridized probe, and then washed in 0.1X SSC at 55°C for 30 minutes. Sections were then immersed in NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY), exposed for 3 weeks at 4°C, developed, and counterstained with hematoxylin and eosin. Tissue morphology and hybridization signal were simultaneously analyzed by darkfield and standard illumination for brain (one sagittal and two coronal sections), gastrointestinal tract (esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon), pituitary, liver, lung, heart, spleen, thymus, lymph nodes, kidney, adrenal, bladder, pancreas, salivary gland, male and female reproductive organs (ovary, oviduct, and uterus in the female; and testis, epididymus, prostate, seminal vesicle, and vas deferens in the male), BAT and WAT (subcutaneous, perirenal), bone (femur), skin, breast, and skeletal muscle.

The Secs-1 probe produced a clear signal with little background. In both the embryonic and adult tissue, the strongest signal was detected in the epithelial cells of the gastrointestinal system. In adult tissues, intense labeling was specifically found in the epithelial cells of the cheek, ventral tongue, esophagus, and large intestine. A moderate signal was observed in the distal ileum, and no expression was detected in

WO 01/98497

PCT/US00/32479

the stomach or proximal sections of the small intestine. While a moderate level of expression was detected in the epithelial cells of embryonic gut, a strong signal was observed in the developing salivary glands.

In tissues from other than the gastrointestinal system, a moderate to strong signal was detected in the developing spermatids of the seminiferous tubules of the testis, some portions of the uterus, and in the epithelial cells of the nipple. A moderate level of expression was detected in the epithelial cells of the skin and nasal cavity. Lower levels of expression were also found in the lymph node, spleen, thymus, and humerus and tibia of the forelimb.

10

The expression of human Secs-1 mRNA and murine Secs-1 mRNA in several human tumor models or in host or xenograft transplants was analyzed by *in situ* hybridization. The expression of human Secs-1 mRNA and murine Secs-1 mRNA at several time points in a mouse wound healing model and in a psoriasis (flaky skin) model was also analyzed by *in situ* hybridization. The Secs-1 polypeptide was initially identified by proteomic analysis of conditioned media from human squamous cell and colorectal carcinoma cell lines. In prior *in situ* hybridization experiments, a discrete labeling in the epithelial layer of the oral mucosa and gastrointestinal tract was observed. Preliminary studies have also indicated that the

20

Secs-1 gene is down-regulated in colon and prostate tumors. Constructs containing a 292 bp murine Secs-1 probe sequence and a 504 bp human Secs-1 probe sequence were linearized with Nco I and antisense ³²P-labeled RNA probes were synthesized from each construct using Sp6 RNA polymerase. *In situ* hybridization was performed using standard protocols on slides containing 5 µm sections of tissue samples that were immersion fixed and paraffin embedded. Tissue samples were hybridized overnight at 55°C and then washed several times in SSC (at high stringency wash of 30 minutes at 55°C in 0.1X SSC). Following washing, slides were exposed to emulsion for 3 weeks and then were developed and counterstained with hematoxylin and eosin.

25

Figures 5 and 6 illustrate the expression of human Secs-1 mRNA and murine Secs-1 mRNA as detected by *in situ* hybridization in a human epidermoid carcinoma

30

WO 01/98497

PCT/US00/32479

(A431) xenograft (Figure 5) or in human prostate carcinoma (PC-3) and human colon carcinoma (HT-29) cell lines (Figure 6). *In situ* hybridization was also performed using a human colon carcinoma (HCT-116) cell line. Little Secs-1 signal was detected in the PC-3 prostate tumor (see Figure 6, top row, middle panel) or HCT-116 colon tumor cell lines. Moderate Secs-1 mRNA expression was observed in a small proportion of the HT-29 colon tumor cell line (see Figure 6, third row, middle panel). The strongest Secs-1 mRNA expression, however, was detected in the A431 human epidermoid tumor xenograft (see Figure 5, top row, right panel). This abundant signal was found scattered throughout the tumor mass but seemed to be more concentrated in the deeper, rather than superficial, aspects of the tumor mass. Little Secs-1 expression was found in regions of necrosis.

Regardless of the type of xenograft examined, all of the mouse hosts showed patches of strong Secs-1 mRNA expression in the overlying skin epithelial cells (see Figure 5, bottom row, right panel; Figure 6, second row, middle panel; Figure 6, bottom row, middle panel), suggestive of proliferating cells. However, Brdu staining for proliferating cells in selected xenografts did not show a correlation with Secs-1 mRNA expression in the epidermis (Figure 6, right panels). Similarly, Brdu staining in the HT-29 xenograft did not show a correspondence with the patches of neoplastic cells expressing Secs-1 mRNA.

With such strong Secs-1 mRNA expression evident in the epidermis overlying the tumor xenografts, an additional *in situ* hybridization was performed to examine temporal changes in epithelial cell Secs-1 mRNA expression in a non-tumor mouse wound healing model at three time points following a dermal punch biopsy. Figure 7 illustrates the results of this analysis. On days 3 and 4 post-injury, a robust Secs-1 mRNA expression was detected in proliferating skin epidermis at the margins of the dermal ulcer (Figure 7, first and second rows) and extending away from the injury to include much of the epidermis sampled. Because the initial punch biopsy removed the epidermis, no epithelial cells and thus no signal was observed beneath the ulcer at these early time points. By day 8, however, the epidermis beneath the wound had regenerated and a strong Smac2 mRNA expression was detected, with the signal extending to the margins of the injury and beyond.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Secs-1 mRNA expression was also examined in a mutant mouse model of psoriasis (flaky skin mouse). Unlike the results obtained in an examination of the wound healing model, the psoriasis model was found to exhibit a hyperproliferative epidermis which is chronic and somewhat more disorganized. *In situ* hybridization in this model showed the same strong Secs-1 mRNA expression in the skin epithelial cells (Figure 7, bottom row) as compared to undetectable levels in the normal control (Figure 7, fourth row).

Example 4: Production of Secs-1 Polypeptides

10 A. Expression of Secs-1 Polypeptides in Bacteria

To prepare a human Secs-1 bacterial expression vector, a human Secs-1 cDNA sequence was first prepared by PCR amplification of 1 µg of a human Secs-1 cDNA clone in a reaction mix containing 0.4 pmol of amplimers corresponding to the human Secs-1 gene (5'-A-A-A-T-A-A-C-A-T-A-T-G-A-A-A-C-G-T-C-G-T-C-
15 C-A-G-C-T-A-A-A-G-C-C-T-G-G-T-C-A-G-G-C-3'; SEQ ID NO: 18 and 5'-G-G-T-G-A-T-G-G-T-G-A-T-G-G-T-G-C-A-C-C-T-G-T-G-G-A-G-T-G-C-C-C-C-3';
SEQ ID NO: 19) and two Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), in a total reaction volume of 50 µl. Reactions were performed at
20 94°C for 2 minutes for one cycle; 94°C for 45 seconds, 55°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds for 30 cycles. The PCR product generated in this reaction was gel-purified on a 2% agarose gel.

The human Secs-1 PCR product produced in the initial amplification reaction was then re-amplified in a reaction mix containing 0.4 pmol of amplimers corresponding to the human Secs-1 gene (5'-A-A-A-T-A-A-C-A-T-A-T-G-A-A-A-
25 C-G-T-C-G-T-C-C-A-G-C-T-A-A-A-G-C-C-T-G-G-T-C-A-G-G-C-3'; SEQ ID NO: 18 and 5'-G-T-G-G-T-A-G-T-G-G-T-A-G-T-G-G-T-A-A-C-T-A-T-C-C-T-A-G-G-T-A-T-T-T-3';
SEQ ID NO: 20) and two Ready-To-Go PCR Beads, in a total reaction volume of 50 µl. Reactions were performed at 94°C for 2 minutes for one cycle; 94°C for 45 seconds, 55°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds for 30
30 cycles. The amplimers used in the re-amplification reaction were designed to incorporate suitable restriction sites into the human Secs-1 cDNA sequence.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

The pAMG21 (ATCC No. 98113) vector, which contains a *lux* promoter and kanamycin resistance gene, and the PCR products from the second amplification reaction were digested with Bam HI and Nde I. The PCR products were then gel purified and ligated into pAMG21. Ligation products were transformed into GM121

5 (ATCC No. 202174) competent cells by electroporation and transformants selected for kanamycin resistance. Plasmid DNA isolated from selected colonies was then subjected to sequence analysis.

Transformed host cells were incubated in 2XYT medium containing 40 µg/ml kanamycin at 30°C prior to induction. Gene expression was induced by the

10 addition of N-(3-oxohexanoyl)-dl-homoserine lactone to a final concentration of 100 ng/ml followed by incubation at 30°C for four hours. The expression of human Secs-1 polypeptide was evaluated by centrifuging the culture, resuspending and lysing the bacterial pellets, and then analyzing the host cell proteins by SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis.

15

B. Expression of Secs-1 Polypeptide in Mammalian Cells

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a Secs-1 polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to

20 allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary expression vector, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), that contains an Epstein-Barr virus origin of replication, may be used for the expression of Secs-1 polypeptides in 293-EBNA-1 cells. Amplified and gel purified PCR products are

25 ligated into pCEP4 vector and introduced into 293-EBNA cells by lipofection. The transfected cells are selected in 100 µg/mL hygromycin and the resulting drug-resistant cultures are grown to confluence. The cells are then cultured in serum-free media for 72 hours. The conditioned media is removed and Secs-1 polypeptide expression is analyzed by SDS-PAGE.

30 Secs-1 polypeptide expression may be detected by silver staining. Alternatively, Secs-1 polypeptide is produced as a fusion protein with an epitope tag,

WO 01/98497

PCT/US00/32479

such as an IgG constant domain or a FLAG epitope, which may be detected by Western blot analysis using antibodies to the peptide tag.

Secs-1 polypeptides may be excised from an SDS-polyacrylamide gel, or Secs-1 fusion proteins are purified by affinity chromatography to the epitope tag, and
5 subjected to N-terminal amino acid sequence analysis as described herein.

C. Expression and Purification of Secs-1 Polypeptide in Mammalian Cells

Secs-1 polypeptide expression constructs are introduced into 293 EBNA or CHO cells using either a lipofection or calcium phosphate protocol.

10 To conduct functional studies on the Secs-1 polypeptides that are produced, large quantities of conditioned media are generated from a pool of hygromycin selected 293 EBNA clones. The cells are cultured in 500 cm Nunc Triple Flasks to 80% confluence before switching to serum free media a week prior to harvesting the media. Conditioned media is harvested and frozen at
15 -20°C until purification.

Conditioned media is purified by affinity chromatography as described below. The media is thawed and then passed through a 0.2 µm filter. A Protein G column is equilibrated with PBS at pH 7.0, and then loaded with the filtered media. The column is washed with PBS until the absorbance at A_{280} reaches a baseline.
20 Secs-1 polypeptide is eluted from the column with 0.1 M Glycine-HCl at pH 2.7 and immediately neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 8.5. Fractions containing Secs-1 polypeptide are pooled, dialyzed in PBS, and stored at -70°C.

For Factor Xa cleavage of the human Secs-1 polypeptide-Fc fusion polypeptide, affinity chromatography-purified protein is dialyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 at pH 8.0. The restriction protease Factor Xa is
25 added to the dialyzed protein at 1/100 (w/w) and the sample digested overnight at room temperature.

Example 4: Production of Anti-Secs-1 Polypeptide Antibodies

30 Antibodies to Secs-1 polypeptides were generated using procedures as described in Hudson and Bay, *Practical Immunology* (2nd ed., Blackwell Scientific

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Publications). Specifically, rabbits were immunized with a chemically synthesized Secs-1 peptide (C-W-V-V-P-G-A-L-P-Q-I; SEQ ID NO: 21). Prior to immunization, the Secs-1 peptide sequence was coupled to K-L-H using Maleimide Conjugation Buffer (Pierce Chemical, Rockford, IL) according to the manufacturer's suggested protocols. Rabbits were injected with the Secs-1 peptide and those animals having sufficient serum titer levels as determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were then selected for polyclonal antibody production.

10 Example 5: Expression of Secs-1 Polypeptide in Transgenic Mice

To assess the biological activity of Secs-1 polypeptide, a construct encoding a Secs-1 polypeptide/Fc fusion protein under the control of a liver specific ApoE promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to cause pathological changes that are informative as to the function of Secs-1 polypeptide. Similarly, a construct containing the full-length Secs-1 polypeptide under the control of the beta actin promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to result in ubiquitous expression.

To generate these constructs, PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a Secs-1 polypeptide using primers that correspond to the 5' and 3' ends of the desired sequence and which incorporate restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector. Following amplification, PCR products are gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into an expression vector using standard recombinant DNA techniques. For example, amplified Secs-1 polypeptide sequences can be cloned into an expression vector under the control of the human β -actin promoter as described by Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17:272-74 and Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:2265-73.

Following ligation, reaction mixtures are used to transform an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert and absence of mutation. The Secs-1

WO 01/98497

PCT/US00/32479

polypeptide expression vector is purified through two rounds of CsCl density gradient centrifugation, cleaved with a suitable restriction enzyme, and the linearized fragment containing the Secs-1 polypeptide transgene is purified by gel electrophoresis. The purified fragment is resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, and 0.2 mM EDTA at a concentration of 2 mg/mL.

Single-cell embryos from BDF1 x BDF1 bred mice are injected as described (PCT Pub. No. WO 97/23614). Embryos are cultured overnight in a CO₂ incubator and 15-20 two-cell embryos are transferred to the oviducts of a pseudopregnant CD1 female mice. Offspring obtained from the implantation of microinjected embryos are screened by PCR amplification of the integrated transgene in genomic DNA samples as follows. Ear pieces are digested in 20 µL ear buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, and 500 mg/mL proteinase K) at 55°C overnight. The sample is then diluted with 200 µL of TE, and 2 µL of the ear sample is used in a PCR reaction using appropriate primers.

At 8 weeks of age, transgenic founder animals and control animals are sacrificed for necropsy and pathological analysis. Portions of spleen are removed and total cellular RNA isolated from the spleens using the Total RNA Extraction Kit (Qiagen) and transgene expression determined by RT-PCR. RNA recovered from spleens is converted to cDNA using the SuperScript™ Preamplification System (Gibco-BRL) as follows. A suitable primer, located in the expression vector sequence and 3' to the Secs-1 polypeptide transgene, is used to prime cDNA synthesis from the transgene transcripts. Ten mg of total spleen RNA from transgenic founders and controls is incubated with 1 mM of primer for 10 minutes at 70°C and placed on ice. The reaction is then supplemented with 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at 37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for Secs-1 polypeptide.

Example 6: Biological Activity of Secs-1 Polypeptide in Transgenic Mice

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isoflurane and blood drawn by cardiac puncture. The samples are subjected to hematology and serum chemistry analysis. Radiography is performed after terminal exsanguination. Upon gross dissection, major visceral organs are subject to weight analysis.

Following gross dissection, tissues (*i.e.*, liver, spleen, pancreas, stomach, the entire gastrointestinal tract, kidney, reproductive organs, skin and mammary glands, bone, brain, heart, lung, thymus, trachea, esophagus, thyroid, adrenals, urinary bladder, lymph nodes and skeletal muscle) are removed and fixed in 10% buffered Zn-Formalin for histological examination. After fixation, the tissues are processed into paraffin blocks, and 3 mm sections are obtained. All sections are stained with hematoxylin and eosin, and are then subjected to histological analysis.

The spleen, lymph node, and Peyer's patches of both the transgenic and the control mice are subjected to immunohistology analysis with B cell and T cell specific antibodies as follows. The formalin fixed paraffin embedded sections are deparaffinized and hydrated in deionized water. The sections are quenched with 3% hydrogen peroxide, blocked with Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), and incubated in rat monoclonal anti-mouse B220 and CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). Antibody binding is detected by biotinylated rabbit anti-rat immunoglobulins and peroxidase conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) with DAB as a chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA). Sections are counterstained with hematoxylin.

After necropsy, MLN and sections of spleen and thymus from transgenic animals and control littermates are removed. Single cell suspensions are prepared by gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100 mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed twice, counted, and approximately 1×10^6 cells from each tissue are then incubated for 10 minutes with 0.5 μ g CD16/32(Fc γ III/II) Fc block in a 20 μ L volume. Samples are then stained for 30 minutes at 2-8°C in a 100 μ L volume of PBS (lacking Ca^{2+} and Mg^{2+}), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5 μ g antibody of FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD90.2 (Thy-1.2), CD45R

WO 01/98497

PCT/US00/32479

(B220), CD11b(Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

5 Example 7: Biological Activity of Murine Secs-1 Polypeptide

The Secs-1 polypeptide/Fc fusion construct prepared in Example 6 is used to analyze the direct binding of Secs-1 polypeptide to members of the RGF family of growth factors.

10 The expression of Secs-1 polypeptide in bone marrow stromal cell lines has been shown to correlate with the ability of stromal cells to maintain hematopoietic stem cells. If the ability of stromal cells to maintain hematopoietic stem cells is due to the expression of Secs-1 polypeptide, rather than being merely correlative, the expression of Secs-1 polypeptide in a non-supportive stromal cell line will convert that cell line into a supportive one. Similarly, if the expression of Secs-1
15 polypeptide in ST2 cells causes these cells to support osteoclastogenesis in the absence of dexamethasone and vitamin D3, this result would suggest that the strong induction of Secs-1 polypeptide expression by dexamethasone and vitamin D3 is not merely an innocent bystander effect but is causally involved in the appearance of the osteoclast support phenotype.

20

While the present invention has been described in terms of the preferred embodiments, it is understood that variations and modifications will occur to those skilled in the art. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - 5 (a) the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4;
 - (b) the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 and PTA-1755;
 - (c) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either
 - 10 SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
 - (d) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (c); and
 - (e) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (c).
- 15 2. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set
 - 20 forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
 - (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 and PTA-1755, or (a);
 - 25 (c) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 and PTA-1755, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic;

WO 01/98497

PCT/US00/32479

(d) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 and PTA-1755, or any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (d); and

(f) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (d).

3. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

WO 01/98497

PCT/US00/32479

- (f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- (g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (f); and
- 5 (h) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (e).
4. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
- 10 5. A host cell comprising the vector of Claim 4.
6. The host cell of Claim 5 that is a eukaryotic cell.
7. The host cell of Claim 5 that is a prokaryotic cell.
- 15 8. A process of producing a Secs-1 polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.
- 20 9. A polypeptide produced by the process of Claim 8.
10. The process of Claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native Secs-1 polypeptide operatively linked to the DNA encoding the Secs-1 polypeptide.
- 25 11. The isolated nucleic acid molecule according to Claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.
- 30

WO 01/98497

PCT/US00/32479

12. A process for determining whether a compound inhibits Secs-1 polypeptide activity or Secs-1 polypeptide production comprising exposing a cell according to any of Claims 5, 6, or 7 to the compound and measuring Secs-1 polypeptide activity or Secs-1 polypeptide production in said cell.

5

13. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and

10 (b) the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 and PTA-1755.

14. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

15 (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 6, optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an ortholog of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

20 (c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

25 (d) a fragment of the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic; and

30 (e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit Nos. PTA-1753 and PTA-1755, or any of (a) - (c).

WO 01/98497

PCT/US00/32479

15. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and

(e) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

17. The isolated polypeptide according to Claim 14, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

18. A selective binding agent or fragment thereof which specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or a fragment thereof.

20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.

21. The selective binding agent of Claim 18 that is a humanized antibody.

22. The selective binding agent of Claim 18 that is a human antibody or fragment thereof.

23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.

24. The selective binding agent Claim 18 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.

25. The selective binding agent of Claim 18 that is a chimeric antibody or fragment thereof.

26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.

27. The selective binding agent of Claim 18 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

28. The selective binding agent of Claim 18 that is a variable region fragment.

5 29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.

30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

10 31. The selective binding agent of Claim 18 that is bound to a detectable label.

32. The selective binding agent of Claim 18 that antagonizes Secs-1
15 polypeptide biological activity.

33. A method for treating, preventing, or ameliorating a Secs-1 polypeptide-related disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to Claim 18.

20 34. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

25 35. A hybridoma which produces a selective binding agent which is capable of binding a polypeptide according to any of Claims 1, 2, or 3.

36. A method of detecting or quantitating the amount of Secs-1 polypeptide using the anti-Secs-1 antibody or fragment of Claim 18.

30

WO 01/98497

PCT/US00/32479

37. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

38. The composition of Claim 37, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or anti-oxidant.

39. The composition of Claim 37, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 6.

10

40. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

41. The polypeptide of Claim 40 that is covalently modified with a water-soluble polymer.

15

42. The polypeptide of Claim 41, wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.

20

43. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

25

44. The composition of Claim 43, wherein said nucleic acid molecule is contained in a viral vector.

45. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

30

WO 01/98497

PCT/US00/32479

46. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.

47. The fusion polypeptide of Claim 46, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

48. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical condition comprising administering to a patient the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid of any of Claims 1, 2, or 3.

49. The method of Claim 48 wherein the medical condition being treated, prevented, or ameliorated is a hematopoietic disorder, osteoporosis, osteopetrosis, osteogenesis imperfecta, Paget's disease, periodontal disease, hypercalcemia, acute glomerulonephritis, chronic glomerulonephritis, cancer, diabetes, obesity, or cachexia.

50. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 in a sample; and

(b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

51. A device, comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a protein of any of Claims 13, 14, or 15; and

said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

52. A method of identifying a compound which binds to a Secs-1 polypeptide comprising:

- (a) contacting the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 with a
5 compound; and
(b) determining the extent of binding of the Secs-1 polypeptide to the
compound.

53. The method of Claim 52, further comprising determining the activity
10 of the polypeptide when bound to the compound.

54. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal
comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of Claims
1, 2, or 3.

15 55. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid
molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

56. A process for determining whether a compound inhibits Secs-1
20 polypeptide activity or Secs-1 polypeptide production comprising exposing a
transgenic mammal according to Claim 55 to the compound, and measuring Secs-1
polypeptide activity or Secs-1 polypeptide production in said mammal.

WO 01/98497

PCT/US00/32479

FIG. 1

```

gcttctctccc taggcgtgag actccggctc cttcact atg aga ctt cta gcc ctt 55
                               Met Arg Leu Leu Ala Leu
                               1       5
tcc ggt ctg ctc tgc atg ctg ctc ctc tgt ttc tgc att ttc tcc tca 103
Ser Gly Leu Leu Cys Met Leu Leu Leu Cys Phe Cys Ile Phe Ser Ser
10       15       20
gaa ggg aga aga cat cct gcc aag tcc ttg aaa ctc agg oga tgc tgt 151
Glu Gly Arg Arg His Pro Ala Lys Ser Leu Lys Leu Arg Arg Cys Cys
25       30       35
cac cta tot cct aga tcc aag ctg aca acc tgg aaa gga aac cac aca 199
His Leu Ser Pro Arg Ser Lys Leu Thr Thr Tyr Lys Gly Asn His Thr
40       45       50
agg ccc tgc aga ctc tgc aga aac aag cta cca gtc aag tca tgg gtg 247
Arg Pro Cys Arg Leu Cys Arg Asn Lys Leu Pro Val Lys Ser Trp Val
55       60       65       70
gtg cct ggg gct ctc cca cag ata tag ggcctctccc gccagatga 294
Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Ile
75
agcgttgatg gccagatgtg gagacaccag aagcataccg actatgttgc cttgcccttt 354
gccaatgagc tctgacactg gaatgcttca cttcagacat cagggcggat ggattgcaga 414
attccaagtc ctcattccaa aggtgtcacc aaccttcaga gtcactaagg tccaggtcca 474
gccacaagt caccatggct cctccagagt aaagtcacca gattccacct gtgggagcta 534
cagatccaga gactttcaag ctgactagag tgcagagaag caagacctca gtgtgatcag 594
ccgagactac agcatcttgg gaacctccag tcagcccca accctaaca cttaaccaact 654
ggtctccaaa ccaaacctg taacttcta atgaatcat caggaggata ccaaaagaaa 714
taaacataa atcagcatac acactaaaaa 744

```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

FIG. 2

```

ggaacgaggg aaaatctgcc ttctcacc atg agg ctt cta gtc ctt tcc agc 52
      Met Arg Leu Leu Val Leu Ser Ser
      1           5
ctg ctc tgt atc ctg ctt ctc tgc ttc tcc atc ttc tcc aca gaa ggg 100
Leu Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Phe Ser Ile Phe Ser Thr Glu Gly
10           15           20
aag agg cgt cct gcc aag gcc tgg tca ggc agg aga acc agg ctc tgc 148
Lys Arg Arg Pro Ala Lys Ala Trp Ser Gly Arg Arg Thr Arg Leu Cys
25           30           35           40
tgc cac cga gtc cct agc ccc aac tca aca aac ctg aaa gga cat cat 196
Cys His Arg Val Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Leu Lys Gly His His
45           50           55
gtg agg ctc tgt aaa cca tgc aag ctt gag cca gag ccc cgc ctt tgg 244
Val Arg Leu Cys Lys Pro Cys Lys Leu Glu Pro Glu Pro Arg Leu Trp
60           65           70
gtg gtg cct ggg gca ctc cca cag gtg tag caactccaaa gcaagactcc 294
Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Val
75           80
agacagcgga gaactcctatg cctggcacct gaggtaccca gcagcttctt gtctccctt 354
tcagccttca cagcagtgag ctgcaatgtt ggagggttct atctogggct gcaaggaccc 414
tgggaaagt ccagaaactcc acgtccttgt ctcaattgtg caatcaactt tcagagctat 474
catgagccaa cctcacccca cagggcctca gtcgccacca tgtgggcctc tccagtgcaa 534
accaccgagc attccacccat gaccggtcac agctacaaat ccagagaccc tcaatcctgc 594
tagagtgcag ggtggcaagc acccaagggt ggctgaccaa gactgcagag tctctccat 654
cttcaggtcc attcagcttc ctgacattta actaccagca tccagtgctc cccaaggaaat 714
ccctctctag cctcctgaca tgagtctgct ggaagagca tccaaacaaa caagtaataa 774
ataaataaat aaactcaatg cagacacaaa aa 806

```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

FIG. 3

1
50
rat Secs-1
murine Secs-1
human Secs-1

51
81
rat Secs-1
murine Secs-1
human Secs-1

3/12

MRLLTLGLF FMLFLCLCVL SSEGRKRPAAK F...PKLRPR CHLSPRSKPI
MRLLALSGLL CMLLFCFIF SSEGRHRAK S...LKLRR CHLSPRSKLT
MRMLVLSLL CILLCFIF STEGRRRAK AMSGRETRLC CHRVSPENST
TWKGNHTRPC RPCR.KLESN SWVPGALPQ I
TWKGNHTRPC RLCKNLPAK SWVPGALPQ I
NLKGHVRLC KPCKLEPEPR LWVPGALPQ V

• • •

• • •

FIG. 4B

```

780      GAGATTACAGGTGCCACCCACCAGCCAGCTAAATTTTGTATTTTTAGTACAGACAGGT
1226      GAGATTACAGGTGCCACCCACCAGCCAGCTAAATTTTGTATTTTTAGTACAGACAGGT

840      TTACCATCTTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCACTACCTCGTAATCCTCCACCTCGGCC
1286      TTACCATCTTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCACTACCTCGTAATCCTCCACCTCGGCC

900      TCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGGGCCCAATGCTGGCTGCGCTTCTTGATTGAG
1346      TCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGGGCCCAATGCTGGCTGCGCTTCTTGATTGAG

960      ATAGTGTAGTGTTCGAATCCATTTTTCTCTGTCTAACCCCTTAGAATCTGCTACATTT
1406      ATAGTGTAGTGTTCGAATCCATTTTTCTCTGTCTAACCCCTTAGAATCTGCTACATTT

1020      . . . . .
1466      ATTTTGTGTTTAGTGCTTATGTTACTCAAACTTTTGGTGCGGGGAGCTGGAGCTATA

1080      . . . . .
1526      GAATATATATAAGAGAGAAAAAACTCAATTCATGATTCAAGATAGCCATGTTCAAC

1140      . . . . .
1586      ATTTTGTGTTATTTCCTTGCAATGTAGAAATTTTAAAAAATTAATTGATGATCCTATATGTT

1200      . . . . .
1646      AAGGTATATCTTTTTTATTATCACTATATATATTGTTATATACACCCAAAATGCTTAT

1260      . . . . .
1706      GATTGAAGATATTCTGGGAAGCATTTTACAACCCAGTGTCAAGCAGCAGCCATCTCTGAGTAG

1320      . . . . .
1766      TGGGATTATAACAAGTGTTTGTGTTTACAAAGTTTCTCGGATGAAGAAATGTCCACATATAT

1380      . . . . .
1826      AATAAGAGAAACAGTGATTAGAAATCTCTATAAAACACGCCCCGTGACATCAATTTATCA

1440      . . . . .
1886      GACCTCTATTTTTCACATGTTGGAGGTGGCCAGTGATACCCCTAGTGACAAATTAATGAG

1500      . . . . .
1946      GATAGATACCTTCCCCCATATAAGTTTCCATCTCATTTAGGACTATCTGTAGCAAACTCT

```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

FIG. 4C

```
1560 . . . . .
2006 GAAGTAGCATTAACTCACTAATATTTTCAGGTATACTTGCTACAAAGTGAACGTACTATG
-----
1620 . . . . .
2066 ATGCAATTTACATGCTTAGACATTAGATAGTTCACAAATGGTGGCTTTTCCCTTTTGA
-----
1680 . . . . .
2126 GCAAGATCTTGCTCTCTTGCCAGGTCCGAGTGCAGTGCATGACCACGGCTCAGTGCAG
-----
1740 . . . . .
2186 GCTTGACTTCCAGGCTCAAGCAATACCTGCACCTCAGGTTTTCCTAGTGCCTGGGAAAC
-----
1800 . . . . .
2246 AGGTGGCGCAACCAATGCTCTGCTAATTTTAAATTTTTCGAGAGACGAGTCTCTCT
-----
1860 . . . . .
2306 AAGTTGCCAGGCTGCTCTGAACTTCAGACTCAAGCCATCCTCCACCTTGGCCTCC
-----
1920 . . . . .
2366 AGAGTGTCTAGGATCCCGGCATGAGCCACACCTGGCTACTTTGCAATTTTAATTA
-----
1980 . . . . .
2426 TGTGTAAGAGGTATATATGATACATTAAGTATGTCCTTTATTCAGGCTTTTTCCTTTT
-----
2040 . . . . .
2486 TTCTTTTCTTTTATTTTCTTTGAGACGAAGTTTTCCTCTTGTTGTCAGGCTGGAGGTAA
-----
2100 . . . . .
2546 TGGCATGCTCTTGGCTCACCAACCTCCGCCGCCGGTTCAGGTGATTCTCTGCTC
-----
2160 . . . . .
2606 AACCTCCTGAGTAGCTGGGATTACNGGCATGCACCAACATGCCAGGCTGATTGTGTTT
-----
2220 . . . . .
2666 TTAGTAGAGATGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCTCGAACACTCGACCTCAAGT
-----
2280 . . . . .
2726 GATCCGCCACCTCAGCCTCCCAAGGCTAGGATTACAGGCTAGGCGACCAACACCCAG
-----
```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

FIG. 4D

```
2340 . . . . .
2786 CTCAGGGCTTATTTCTTAGGCTAGATTGCCAAGGGGAGAATTATTATGTCAAAGAAACT
-----
2400 . . . . .
2845 ACTTATTGGACAGGAATCTGAAAGGATGTGTTTGGGGCCATGTTCTCCCAACATTGT
-----
2460 . . . . .
2906 TATTCTGAAAGTAATCACAACAGGCCCTCTTCCCTAGGACCTCTCGTAGCCTG
-----
2520 . . . . .
2965 GCTCATCCTGAGTTTCTCTGGATAAATATTCCTGAGCCCTGTGCCITGGAGGGGAAGCT
-----
2580 . . . . .
3025 CACTCACAGACAGGCCACTAAGACAGTCTCTCTCTCTTTGTTGCCACCTCAGGGGAG
-----
25 . . . . . G K

2640 . . . . .
3085 AGGCGTCTGCCAAGGCTGCTGTCAGGCAGGAGAACAGGCTCTGCTGCCACCGAGTCCCT
-----
26 R R P A R A W S G R R T R L C C H R V P

2700 . . . . .
3145 AGCCCCAATCAGCAAACTGAAAGGTAAATACCCCCCTCTCTCCAGACTGTGGGGCAG
-----
45 S P N S T M L K

2760 . . . . .
3205 AAGTCTACAGTGGCCATGGGACCCAGCCACACACTGATCAGCCCCCCTCCATGGCTGG
-----
2820 . . . . .
3265 CATCAGGCTCTGGCTGGGAGGACATCTTTGTTTGTGATTAAATTTGTGACTCCCCCCC
-----
2880 . . . . .
3325 AAAAGTCAACAAATTAATCATTTTAAACTGAATAGATTCTGCCATGCAAAAGCAGGA
-----
2940 . . . . .
3385 TGCAATTAGCAGATGTTGTGTGGAACACACTTACTTTAGGTGGAGGCTCTCTGAGCAGG
-----
3000 . . . . .
3445 TGACATTATGAGACCTGCTCATTTATGAGCCAGGAGCCTGGCTGAGGCTGTGGAGGT
-----
```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

FIG. 4E

```
3060      . . . . .
3506 GGGGCATGCAGGCGAGAGGAGGCAGCAGGGGTGAGGGGCAAGAGTGGGCTATGGAACACAG
-----
3120      . . . . .
3566 ATGGTAGCAGGGCTTGAGAGGTACTCCAGAGCTAAGGACCAAGGCTGGCTGTGAACCC
-----
3180      . . . . .
3626 TGTGGACCTGGGGCAACAGATCAGCATGCAGGTCAACAGCAGGGAGTGGGCTGAGGCTC
-----
3240      . . . . .
3686 CACAGAGCCATAGCTTGGCAGGAGATAGGCAGCCCGAGAGATGCCAGAGGCGAGCATCC
-----
3300      . . . . .
3746 AGGCTGCTAGACAGAACGAGGCCCGAGAGAGCAAGGCTGCCCTCTCCCTGAGGCTTGGG
-----
3360      . . . . .
3806 GACACTGGGAGGCTGTGGCGGACAGGCCCAAGCTCAGGAGGGCTGGGGCCACCCAGTTC
-----
3420      . . . . .
3866 CCTGACACAGGGGCTGCAGGCCAGAGCGATATTCACTGGAGTTGCCAGGCCAGGTGGA
-----
3480      . . . . .
3926 AGGGTCAGGCTGCTGGAGCTTGGGTAGGGCAGGCAGATCCCCAAGGGGAGACTGTGGACC
-----
3540      . . . . .
3986 CTGAGTCAGACAGGCTGACACCAAGCTGGGGCTCTGCTGAAGCTCTGAGGCCCGAGTGC
-----
3600      . . . . .
4046 CCACCTCTCAGAGGCTGAGGAGGTCCCGGCCCACTTGCTCTCTGGGGCAAGGCCCAT
-----
3660      . . . . .
4106 GGGGTCCCTGACCCAGCGCGGAGCCTCCATGCCCTTCCAGCTACCAAGGGGATGCTCAG
-----
3720      . . . . .
4166 CTGTGATGCAGGAGAGGGATAGAGGGAGGAGCAAGACAGCATGACTCCAGCCCGAGACC
-----
3780      . . . . .
4226 TTCTCCCGAGATGCTGACAGGCCCTTCTTCCAACTGGCATCACACCCAGCCGGCCAGG
-----
```

FIG. 4F

```

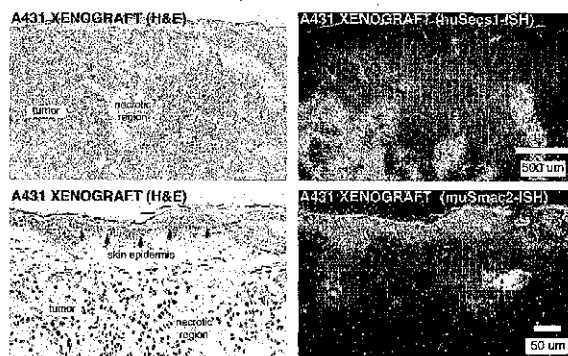
3840
4285 ATAAAAATAACCAAGCTCGTCTTTCACCAACGGGCTGAAGGATCCCNRRNNNNNNNNRNCACGAA
:
:
:
3900
4345 AGCCCCCTCTGGGCTCCAGGGAAAGCATAAGACTCTAATTCCTGCTTTGAATTTTATT
-----
:
:
:
3960
4405 TTAAATGTGTTTGAAATGCAACTTAATGTGGTTTCCCTCTCTCCCCACAACTGGCT
-----
:
:
:
4020
4465 CTACGCTCGGCCATCTTCCTGCTCCTTGTCCCTCTGTGCTACTGCAATGCTCTCCCAAGGACA
-----
:
:
:
55
:
:
:
G H
:
:
:
4080
4525 TCMCTGAGGCTCTGTAAACCATCGACGCTTGAGCCAGAGCCCCGCCCTTTGGGTGGTGCC
:
:
:
56 K V R L C X P C K L E P E P R L W V V P
:
:
:
4140
4585 TGGGGCACTCCCAAGGTG
:
:
:
75 G A L P Q V

```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

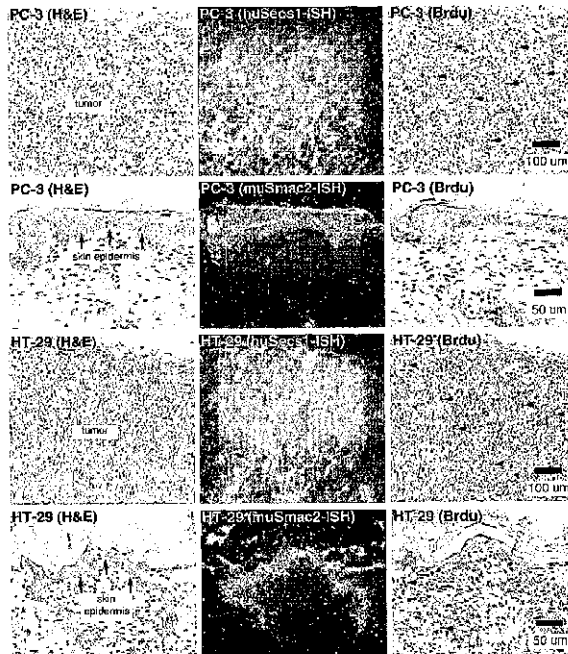
FIG. 5



WO 01/98497

PCT/US00/32479

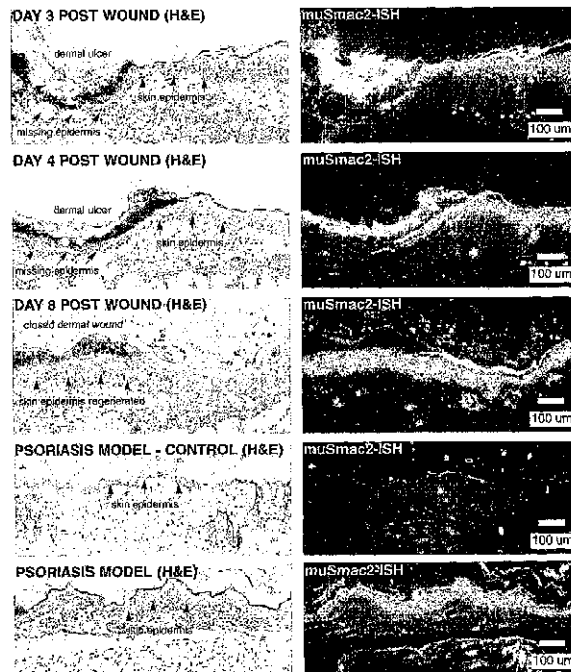
FIG. 6



WO 01/98497

PCT/US00/32479

FIG. 7



WO 01/98497

PCT/US00/32479

SEQUENCE LISTING

<110> Polverino, Anthony J.
 Luethy, Roland
 Patterson, Scott

<120> Secreted Epithelial Colon Stromal-1 Molecules and Uses
 Thereof

<130> 00,450-A

<140>
 <141>

<150> 09/599,087
 <151> 2000-06-21

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 744
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (38)..(274)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (38)..(109)

<400> 1
 gcttcctccc taggcgtgag actccggctc ctccact atg aga ctt cta gcc ctt 55
 Met Arg Leu Leu Ala Leu
 1 5

tcc ggt ctg ctc tgc atg ctg ctc ctc tgt ttc tgc att ttc tcc tca 103
 Ser Gly Leu Leu Cys Met Leu Leu Leu Cys Phe Cys Ile Phe Ser Ser
 10 15 20

gaa ggg aga aga cat cct gcc aag tcc ttg aaa ctc agg cgc tgc tgt 151
 Glu Gly Arg Arg His Pro Ala Lys Ser Leu Lys Leu Arg Arg Cys Cys
 25 30 35

cac cta tct cct aga tcc aag ctg aca acc tgg aaa gga aac cac aca 199
 His Leu Ser Pro Arg Ser Lys Leu Thr Thr Trp Lys Gly Asn His Thr
 40 45 50

agg ccc tgc aga ctc tgc aga aac aag cta cca gtc aag tca tgg gtg 247
 Arg Pro Cys Arg Leu Cys Arg Asn Lys Leu Pro Val Lys Ser Trp Val
 55 60 65 70

gtg cct ggg gct ctc cca cag ata tag ggcctcctcc gccagatga 294
 Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Ile
 75

agcgttgatg cccagatgtg gagacaccag aagcatacac actatgttgc ctgcccctt 354

WO 01/98497

PCT/US00/32479

gccaatgagc tctgacacty gaatgcttca cttcagacat cagggcggat ggattgcaga 414
 attccaagtc ctcatccaa aggtgtcacc aaccttcaga gtcactaagy tccaggtcca 474
 gccacacaagt caccatggct cctccagagt aaaagtccaa gattccacct gtgggagcta 534
 cagatccaga gactttcaag ctgactagag tgcagagaag caagacctca gtgtgatcag 594
 ccgagactac agcatcttgg gaacctctag tcagcccca acccctaaca cttaacctact 654
 ggtctccaaa ccaacacctg taacttcta atgaatcat caggaggata ccaaaagaaa 714
 taaccataa atcagctac acactaaaa 744

<210> 2
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2
 Met Arg Leu Ala Leu Ser Gly Leu Leu Cys Met Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Phe Cys Ile Phe Ser Ser Glu Gly Arg Arg His Pro Ala Lys Ser Leu
 20 25 30
 Lys Leu Arg Arg Cys Cys His Leu Ser Pro Arg Ser Lys Leu Thr Thr
 35 40 45
 Trp Lys Gly Asn His Thr Arg Pro Cys Arg Leu Cys Arg Asn Lys Leu
 50 55 60
 Pro Val Lys Ser Trp Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Ile
 65 70 75

<210> 3
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3
 Arg Arg His Pro Ala Lys Ser Leu Lys Leu Arg Arg Cys Cys His Leu
 1 5 10 15
 Ser Pro Arg Ser Lys Leu Thr Thr Trp Lys Gly Asn His Thr Arg Pro
 20 25 30
 Cys Arg Leu Cys Arg Asn Lys Leu Pro Val Lys Ser Trp Val Val Pro
 35 40 45
 Gly Ala Leu Pro Gln Ile
 50

<210> 4
 <211> 806
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

WO 01/98497

PCT/US00/32479

```

<220>
<221> CDS
<222> {29}..(274)

<220>
<221> sig_peptide
<222> {29}..(100)

<400> 4
ggacgaggg aaaatctgcc ttctcacc atg agg ctt cta gtc ctt tcc agc 52
Met Arg Leu Leu Val Leu Ser Ser
1 5

ctg ctc tgt atc ctg ctt ctc tgc ttc tcc atc ttc tcc aca gaa ggg 100
Leu Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Phe Ser Ile Phe Ser Thr Glu Gly
10 15 20

aag agg cgt cct gcc aag gcc tgg tca ggc agg aga acc agg ctc tgc 148
Lys Arg Arg Pro Ala Lys Ala Trp Ser Gly Arg Arg Thr Arg Leu Cys
25 30 35 40

tgc cac cga gtc cct agc ccc aac tca aca aac ctg aaa gga cat cat 196
Cys His Arg Val Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Leu Lys Gly His His
45 50 55

gtg agg ctc tgt aaa cca tgc aag ctt gag oca gag ccc cgc ctt tgg 244
Val Arg Leu Cys Lys Pro Cys Lys Leu Glu Pro Glu Pro Arg Leu Trp
60 65 70

gtg gtg cct ggg gca ctc cca cag gtg tag cactcccaaa gcaagactcc 294
Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Val
75 80

agacagcgga gaacctcatg cctggcacct gaggtaccga gcagcctcct gtctccctt 354
tcagccttca cagcagttag ctgcaatgtt ggagggtctt atctgggctt gcaaggacct 414
tgggaagtt ccagaactcc acgtccttgt ctcaattgtg ccatcaactt tcagagctat 474
catgagccaa cctcaccaca cagggcctca gtgcccaca tgtgggcttc tccagtgcga 534
accaccgagc attccacctt gaccggctac agctacaaat ccagagacca tcaatcctgc 594
tagagtgcag ggtggcaagc acccaagggt ggctgaccaa gactgcagag tctctccat 654
cttcaggtcc attcagcttc ctggcattta actaccagca tccagtgttc cccaaggaa 714
ccttctctag cctctgaca tgagctctgt ggaagagca tccaaacaaa caagtaataa 774
ataataaat aaactcaatg cagacacaaa aa 806

<210> 5
<211> 81
<212> FRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Arg Leu Leu Val Leu Ser Ser Leu Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15

```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Phe Ser Ile Phe Ser Thr Glu Gly Lys Arg Arg Pro Ala Lys Ala Trp
 20 25 30
 Ser Gly Arg Arg Thr Arg Leu Cys Cys His Arg Val Pro Ser Pro Asn
 35 40 45
 Ser Thr Asn Leu Lys Gly His His Val Arg Leu Cys Lys Pro Cys Lys
 50 55 60
 Leu Glu Pro Glu Pro Arg Leu Trp Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln
 65 70 75 80
 Val

<210> 6
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Lys Arg Arg Pro Ala Lys Ala Trp Ser Gly Arg Arg Thr Arg Leu Cys
 1 5 10 15
 Cys His Arg Val Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Leu Lys Gly His His
 20 25 30
 Val Arg Leu Cys Lys Pro Cys Lys Leu Glu Pro Glu Pro Arg Leu Trp
 35 40 45
 Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Val
 50 55

<210> 7
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 7
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Ser Gly Leu Phe Phe Met Leu Phe Leu Cys
 1 5 10 15
 Leu Cys Val Leu Ser Ser Glu Gly Arg Lys Arg Pro Ala Lys Phe Pro
 20 25 30
 Lys Leu Arg Pro Arg Cys His Leu Ser Pro Arg Ser Lys Pro Ile Thr
 35 40 45
 Trp Lys Gly Asn His Thr Arg Pro Cys Arg Pro Cys Arg Lys Leu Glu
 50 55 60
 Ser Asn Ser Trp Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Ile
 65 70 75

<210> 8
 <211> 4159
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

WO 01/98497

PCT/US00/32479

```

<220>
<221> unsure
<222> (160)..(169)

<220>
<221> unsure
<222> (3884)..(3893)

<220>
<221> exon
<222> (1)..(69)

<220>
<221> exon
<222> (2627)..(2725)

<220>
<221> exon
<222> (4079)..(4159)

<400> 8
atg agg ctt cta gtc ctt tcc agc ctg ctc tgt atc ctg ctt ctc tgc 48
ttc tcc atc ttc tcc aca gaa ggtagggcag ccccagggt gcagatccct 99
gagcaggatt tcagcatctg ggaagactct gatcaggatt tgttgaggag caggccttgg 159
nnnnnnnnnn cgcgcgtact tccagccccc tggtagaagac gaaagagggc tctttctcct 219
gaacctatag gtttggggct caggactgac tgcaggtggc ttgggggttc cattcacagc 279
ccctgcaccc ccaaatacat accagcccta agtaagtggt tgtgttcgcc atgcacacac 339
acatacaacc tctcagctag attactgtgc ttaagtccca cctatctaga atttctggag 399
ccattctctt gtacttgtgt catgcttggc acagagtaaa ttagtgttgg gcaaatgaat 459
acattaatta gtgacccata taagtctgaa catcccaaaa cctcatgccc agaaaaatgc 519
catgagcagc tgaatgaag gtgtgtgttg tagggaggtg gggatatgtt atgcattgtt 579
agaaggggac accatctttt taccctctata gatatgaata tttagctctc ttgccctttt 639
ttcttttttc tttttttttt tttttttgag atggagctct gctctgtcac ccaggctgga 699
gtgcagtggt gctatctcag ctccactgaa tctccgcctc ctgggttcaa gcaattctct 759
gctccagcct cccaagtagc tgagattaca ggtgcccacc accaagccca gctaatTTTT 819
gtatttttag tacagacagg ttccaccatc ttggccaggc tggctcttga ctcctaaact 879
cgtaatctct ccacctcggc ctcccaaatg gctgggatta caggcgtgag ccaccatgcc 939
tggctgcctt tcttgaitca gatagctgag tgtttcaatc catTTTTctc ttgtctaacc 999
ctctagaaac tgcctacatt tattttttgt tttagtggtt atggttactc aaacttttgg 1059
gtggggggag ctggagctat agaaatatat aaagagaaga aaaaactctc attccatgat 1119
tcaagagtag ccattgtcaa cattctgctt atttcttgc atgtagaatt tttaaaaatt 1179

```

WO 01/98497

PCT/US00/32479

aattgatgta cctatatgtt caagggtata ttttttttat ttatcaatat atatatgttt 1239
aiaatcaccc aaaatgctta tgatigaaga tattctggaa gcatttacaa cccagtgtca 1299
gcagcagcca tctctgagta gtgggattat aacnagtgtt tgttttcaa agtttctgog 1359
atgaaaatgt cccacatata taataaggaa aacnagtatt agaattcttc ataaacacag 1419
cccgtagcat gcaatttatt agacctctat ttttggacat gttggaggtt gccagtata 1479
ccctagtga aattaaatga ggatagatac ctcccccat aaagtttctt atccatttag 1539
gactatctgt agcaaatctt tgaagttagca ttaacaaact aatattttta ggtataaatt 1599
gctacaagt aacgtactat gatgaattta catgottaga catttagata gttcacatt 1659
gtgtggtttt ctttttttga agcaagatct tgcctctttg cccaggtcgg agtgagtggt 1719
catgacacag gctcagtgca ggtttgactt ccagggctca agcaatactc gcaactcagg 1779
ttttccagta gctgggaaaa caggtgcgca ccacatgct ctgctaattt ttaaaatttt 1839
ttgcagagac gaggtctctc taagtgtccc aggtcgtctt tgaacttctg gactcagacc 1899
atctccacac ctggcctccc cagagtgtca ggatcacagg catgagcacc cacactcgcc 1959
ctacttttga ctttttaatt atgtgtttaa aggtatatat gtacataaag tatgtctctt 2019
attcaggctt tttttctttt tttttttttt ttattttttt gagaagaaat ttttctctt 2079
gttgtcagg ctggagtgtt atggcatgct ctggctcac cacacctcc gctcccggt 2139
ttcaagtgtt tctctgctct caacctctg agtagctggg attacaggca tgcaccaaca 2199
tgccaggctg attttgtatt tttagttag atgggggttc tccatgttgg tccaggtcgt 2259
ctcgaacct cgaactcaag tgatccgccc acctcagctt cccaagagc taggattaca 2319
ggcatgagcc accacacca gctcagggtt tttttcttta ggttagattg ccaaggggag 2379
aattattatg tcaaggaaac taottatttg acaggaatct gaaagagtg tgttttggg 2439
ccatgtgtct cccaacttg ttatttttga aaagtaaatc acaacaagcc cactctttt 2499
cctaggacct ctgtagctt ggctcatctt gagtctctct ggataaatat tctgagccc 2559
tgtgcttgg aagggaagc tcaactcag acaagccac taagagagct ctctctctt 2619
ttgtgtc cac cct cag gga aga ggc gtc ctg coa agg cct ggt cag gca 2668
gga gaa cca ggc tct gct gcc acc gag tcc cta gcc oca act caa caa 2716
acc tga aag gtaagtaccc caacctctc cagaactgtg ggcagaagtt 2765
ctacagtggc catgggacca gccacacaca ctgatcagcc cccacctatg gctggcatca 2825
ggctctggct gggaggacat ctttgttttg ttgattaatt tgttgactcc cccccaag 2885
tcacacatt aatcatttta aactgaatac attotgcat ggaagaaag caggatgca 2945
ttagcagatg ttgtgtggaa acacacttac tttagtgga aggtgtctga gcaggtgaca 3005

WO 01/98497

PCT/US00/32479

```

tttatgagac ctggctcatt tatgagccag gaggctggct gaggcctgtg gagggtgggc 3065
atgcaggcag aggaggcagc aagggtgagc ggcagagtg gggatatgaa gacagatggc 3125
agcagggtct gagaggtact ccagagaagc aaggaccaaa gctgctgtg aacctgtg 3185
acctggggca cagatcagca tgcaggctac oagcaggga gttggcctga ggtccagag 3245
agcctatagc tggcaggaga taaggcagcc ccagagatgc cagcaggcag catccaggc 3305
gcatgaccag aacgaggccc agaagagcaa ggtgcctc tccctgagc ctggggacac 3365
tgaggaggct gtggcggaca ggcaccagc caggagggtc gctggcacc agttccctgc 3425
acaggggctg caggccagc gcagatatto actggagtg ccagccagc gttggaaggc 3485
caggctgctg gagctgggt agggcaggca gatcccaag gggagactgt ggcacctgag 3545
tcagacagcc tgaacccaac ctggggctcc tgcctgaact ctgcagccc agtccctact 3605
ctcagaggcc tgaggaggtc ccggccccc ttgctcctct gggcccatg ccatggggc 3665
ccatgaccag cgcgggagcc tccatgcctt tccagctac caaggggatg ctccagctgt 3725
atgcaggaga gggatagagg gaggagcaca gacagcatga ctccagcgc agacctctc 3785
cggagatgc tgacagccct ttctccaaa ctggcatcac accagccgg ccaggataaa 3845
aataaccagc tctcttccac caagggtga aggatccnn nnnnnnnca cgaagagccc 3905
cttctgggcc tccaggaaa agcataagat ctaattcttg ctttgaatt tttttttaa 3965
tgtgtttgaa aatgcaactt aattgtgtt tctctctct cccacaaac tggctctgac 4025
ctcgcctct tctgtctct gtccctcttg tctactcatt gctcctccca gga cat 4081
cat gtg agg ctc tgt aaa cca tgc aag ctt gag cca gag ccc cgc ctt 4129
tgg gtg gtg cct ggg gca ctc cca cag gtg 4159

```

<210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Met Arg Leu Leu Val Leu Ser Ser Leu Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15

Phe Ser Ile Phe Ser Thr Glu
 20

<210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

WO 01/98497

PCT/US00/32479

Gly Lys Arg Arg Pro Ala Lys Ala Trp Ser Gly Arg Arg Thr Arg Leu
 1 5 10 15

Cys Cys His Arg Val Pro Ser Pro Asn Ser Thr Asn Leu Lys
 20 25 30

<210> 11
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Gly His His Val Arg Leu Cys Lys Pro Cys Lys Leu Glu Pro Glu Pro
 1 5 10 15

Arg Leu Trp Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Val
 20 25

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 12
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: internalizing
 domain derived from HIV tat protein

<400> 13
 Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
 corresponding to human SECS-1

<400> 14
 ccaactcaa caaacctgaa a 21

<210> 15
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 01/98497

PCT/US00/32479

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
 corresponding to human SECS-1

<400> 15
 gggaccactg gatgctg 17

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
 corresponding to murine SECS-1

<400> 16
 actcggctc ctccactatg a 21

<210> 17
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
 corresponding to murine SECS-1

<400> 17
 atgtgggcat catcaacgct tta 23

<210> 18
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
 corresponding to human SECS-1

<400> 18
 aataacata tgaacgctg tccagctaaa gcttggtcag gc 42

<210> 19
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
 corresponding to human SECS-1

<400> 19
 ggtgatggtg atgggtgcac tgtgggagtg cccc 34

WO 01/98497

PCT/US00/32479

<210> 20
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
corresponding to human SECS-1

<400> 20
gtggtagtgg tagtggtagt aactatocctt ggtatttt

37

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: SECS-1 antigen

<400> 21
Cys Trp Val Val Pro Gly Ala Leu Pro Gln Ile
1 5 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/32479
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K17/08 C12Q1/68 A61K38/17 G01N33/53 G01N33/566		
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 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 pertinent, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, STRAND, EMBL, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online' Acc. No. AA422178, 19 May 1997 (1997-05-19) HILLIER ET AL.: "WashU-Merck EST Project 1997" XP002162977 ID: HS1220328, zv31g07.r1 Soares ovary tumor NBH07 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:755292 5', mRNA sequence the whole document ----- -/-	1-7, 11
☒ 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 "B" earlier document 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 specific reason (as specified) "O" documents relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the applicable law called to understate the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document: member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 March 2001		Date of mailing of the international search report 17.04.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818, Patentstrasse 2 NL-2580 LA Rijswijk Tel. (+31) 70 345-2040, Tlx 31 651 epo nl, Fax: (+31) 70 345-2046		Authorized officer Steffen, P

Form PCT/ISA210 (revision 09.01) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Initial Application No.
PCT/US 00/32479

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Acc. No. AI983767, 1 September 1999 (1999-09-01) NCI-CGAP HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/NCICGAP: "National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), Tumor Gene Index" XP002162978 ID: AI983767, wu20a04.x1 Soares_Dieckgraefe_colon_NHCD Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2520558 5', mRNA sequence the whole document ---	1-7,11
X	DATABASE EMBL 'Online! Acc. No. AA283751, 5 April 1997 (1997-04-05) HILLIER ET AL.: "Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags" XP002162979 cited in the application ID: HS1188545, zt19g05.r1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone IMAGE:713624 5', mRNA sequence the whole document ---	1-7,11
X	DATABASE EMBL 'Online! Acc. No. AA238890, 6 March 1997 (1997-03-06) MARRA ET AL.: "The WashU Mouse EST Project" XP002162980 ID: MM1156624, my36d01.r1 Barstead mouse pooled organs MPLR84 Mus musculus cDNA clone IMAGE:697921 5', mRNA sequence the whole document ---	1-7,11
X	DATABASE EMBL 'Online! Acc. No. AA017989, 10 August 1996 (1996-08-10) MARRA ET AL.: "The WashU Mouse EST Project" XP002162981 ID: MMA17989, mh48h07.r1 Soares mouse placenta 4NbMP13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone IMAGE:445789 5', mRNA sequence the whole document --- -/-	1-7,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Initial Application No. PCT/US 00/32479
C (Classification) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HENNINGAN ROBERT F ET AL: "Fos-transformation activates genes associated with invasion." ONCOGENE, vol. 9, no. 12, 1994, pages 3591-3600, XP000985432 ISSN: 0950-9232 cited in the application page 3594; figure 5 & DATABASE EMBL 'Online! Acc. No. S74257, 28 June 1995 (1995-06-28) HENNINGAN ET AL.: "Fos-transformation activates genes associated with invasion." the whole document	1-7,11
P,X	WO 00 43509 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;VINALS BASSOLS CARLOTA (BE)) 27 July 2000 (2000-07-27) SEQ ID NO's 1 & 7 page 2 -page 5	1-7,11

Form PCTISA/210 (continuation of second sheet) (April 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	national application No. PCT/US 00/32479
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2. ☒ Claims Nos.: 18, 19, 31, 32, 33, 34, 35 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International Application, as follows:	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00 82479

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 33, 48, 49, 54 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim 56 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18, 19, 31, 32, 33, 34, 35

Present claims 18, 19, 31, 32, 33, 34, 35 relate to a compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to be a selective binding agent or an antagonist to the Secs-1 polypeptide as set out in SEQ ID NO's: 2 and 5.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the selective binding agent as restricted to antibodies.

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Int. Application No.	
Information on patent family members				PCT/US 00/32479	
Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	
Publication date					
WO 0043509 A		27-07-2000		AU 2292400 A	
				07-08-2000	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) July 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 3/10	A 6 1 P 3/14	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/14	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/42	
C 0 7 K 16/42	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 17/08	
C 0 7 K 17/08	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(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,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ルーシー, ローランド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, ニューバリー パーク, サン マルコ コー
ト 3 9 7 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA06 EA04 GA13 GA14 HA01
HA04 HA14
4B063 QA01 QA05 QQ53 QQ79 QR56 QR77 QS25 QS34 QS36 QX01
QX07
4B064 AG01 AG26 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 CE13
DA01 DA13
4B065 AA91Y AA93X AA93Y AB01 BA02 BA03 BA05 CA24 CA25 CA44
CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA25 DC50
NA14 ZA511 ZA671 ZA701 ZA811 ZA961 ZA971 ZB261 ZC211 ZC351
ZC412 ZC541
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA21 BA41 BA56 CA40 DA75 DA76
EA20 EA50 FA74 GA26