(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 15/57

(11) 공개번호 10-2004-0011480
(43) 공개일자 2004년02월05일

(21) 출원번호 10-2003-7012261
(22) 출원일자 2003년09월19일
번역문 제출일자 2003년09월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/009039
(87) 국제공개번호 WO 2002/77263
(86) 국제출원출원일자 2002년03월20일
(87) 국제공개일자 2002년10월03일

(30) 우선권주장 60/278,166 2001년03월22일 미국(US)

(71) 출원인 덴드레온 샌 디에고 엘엘씨
미국 92121-1102 캘리포니아 산 디에고 사이언스 파아크 로우드 3030

(72) 발명자 메디슨에드윈엘
미국캘리포니아주92121샌디에고세다크레스트웨이11005

예진-천
미국캘리포니아주92126샌디에고웨츠뷰파르웨이11629

(74) 대리인 이병호

심사청구 : 없음

(54) 세린 프로테아제 ＣＶＳＰ14를 암호화하는 핵산 분자,암호화된 폴리펩티드 및 이에 근거한 방법

요약

본원에는 일본쇄 또는 활성화 이본쇄 형태로서 프로테아제 활성을 나타내는 CVSP14 폴리펩티드로 명명된 폴리펩티드가 제공된다. 이러한 폴리펩티드를 사용하여, 이의 프로테아제 활성을 조절하는 화합물을 동정하는 방법이 제공된다. 상기 폴리펩티드는 종양 마커로서 제공되기도 한다.

색인어

세린 프로테아제 CVSP14,

명세서

관련 출원

발명자(Edwin L. Madison and Jiunn-Chern Yeh)에 의해 '트랜스막 세린 프로테아제 14를 암호화하는 핵산 분자, 암호화된 단백질 및 이에 근거한 방법'이란 발명의 명칭으로 2001년 3월 22일자로 출원된 미국 가출원 제60/278,166호에 대한 우선권의 잇점을 청구한다. 허용된다면, 상기 미국 가출원의 전문이 본원에 참조문헌으로써 삽입된다.

기술분야

본원에는 프로테아제 및 이의 일부분, 특히 프로테아제 도메인을 암호화하는 핵산 분자가 제공된다. 또한, 본원에는 상기 프로테아제 및 이의 도메인, 및 이를 암호화하는 핵산 분자를 사용하는 예후, 진단 및 치료 방법이 제공된다.

배경기술

암은 미국에서 사망의 주요 원인이며, 3명의 미국인 중 1명꼴로 발생하며 4 명의 미국인 당 1명꼴로 사망하고 있다. 암은 증식되어 종양괴를 형성하는 비정상적인 신생 세포의 수적 증가, 이러한 신생 종양 세포에 의한 인접 조직의 침입, 및 혈액 또는 림프계를 통해 국부적인 림프절 및 멀리 떨어져 있는 부위로 전이되는 악성 세포의 발생으로 특성화된다.

암의 특징중에는 종양 세포와 이의 환경 사이의 정보전달(communication)의 단절이 있다. 정상 세포는 자극성 신호가 부재시에는 분열하지 않으며, 억제성 신호의 존재하에서는 분열을 종결한다. 성장-자극성 및 성장-억제성 신호는 조직내 세포 사이에서 일상적으로 교환된다. 암 또는 신생물 상태에서는, 세포는 상기 신호들을 '압도하는' 능력을 얻게 되어 정상 세포가 성장하지 않는 조건하에서도 증식하게 된다.

증식하기 위해서, 종양 세포는 유전적 변형을 반증하는 수 많은 독특한 비정상적인 특성들을 얻게 된다. 잘-연구된 특정한 종양의 게놈은 활성화된 종양유전자 및 불활성화된 종양억제유전자를 포함하는, 수 개의 상이한 독립적으로 변형된 유전자를 갖는다. 이러한 유전적 변화 각각은 전체적으로 완전한 신생물 표현형을 나타내는 상기 특성의 일부를 부여하는데 관여하는 것으로 보인다.

다양한 생화학적 인자들이 전이(metastasis)의 상이한 단계와 관련되어져 왔다. 콜라겐, 라미닌 같은 당단백질, 및 프로테오글리칸에 대한 세포 표면 수용체들은 침입과 전이에서 중요한 단계인 종양 세포 부착을 촉진시킨다. 부착은 조직 장벽을 통한 종양 세포의 투과를 촉진하는 분해 효소의 방출을 촉진시킨다. 일단 종양 세포가 표적 조직내로 들어가면, 특정 성장 인자들이 추가의 증식을 위해서 요구된다. 종양 침입 (또는 진행)은 복잡한 일련의 사건들과 관련되며, 이때 종양 세포는 1차 종양으로부터 분리되고 이를 둘러싼 정상 조직을 파괴시키며, 혈관 또는 림프관내로 이동하여 멀리 떨어진 부위로 전달된다. 정상 조직 장벽의 파괴는 조직의 기부막 및 매트릭스 성분들을 구성하는 세포외 매트릭스의 단백질들을 분해시키는 특정 효소들의 정교한 작업에 의해 달성된다.

세포외 매트릭스 분해 단백질 부류는 종양 침입에 연관되어져 왔다. 이들 중에는 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)가 있다. 예를 들면, 매트릭스 메탈로프로테이나제 스트로멜라이신(stromelysin)의 생성은 전이 잠능을 갖는 악성 종양과 관련된다[참조: 예를 들면, McDonnell et al. (1990) Smnrs. in Cancer Biology 1: 107-115; McDonnell et al. (1990) Cancer and Metastasis Reviews 9: 309-319].

암 세포가 전이하여 조직에 침입하는 능력은 기저막 분해에 의해 촉진된다. MMPs를 포함한 몇 가지 프로테이나제 효소가 종양 세포의 침입 과정을 촉진시키는 것으로 보고되었다. MMPs는 기저막 분해를 증강시킴으로써, 종양 세포가 조직 내로 침입할 수 있게 해주는 것으로 보고되어 있다. 예를 들면, 분자량이 약 70kDa 및 92kDa인 2개의 주요 메탈로프로테이나제는 종양 세포의 전이 능력을 증강시키는 것으로 여겨진다.

세린 프로테아제

세린 프로테아제는 신생물성 질병 진행에 밀접한 영향을 끼쳐왔다. 분비된 효소이거나 또는 세포질성 저장 소기관 내에 격리된 효소인 대부분의 세린 프로테아제는 혈액 응고, 상처 치유, 분해, 면역 반응, 및 종양 침입과 전이에 특정 역할 을 수행한다. 부가의 세포외 도메인을 갖는 막-부착된(membrane-anchored) 단백질인, II형 트랜스막 세린 프로테아제로 명명된 특정 부류의 세포 표면 단백질이 동정되었다. 세포 표면 단백질로서, 이들은 세포내 신호전달(signal transduction)에 특정 역할을 하고 또한 세포 표면 단백질분해 사건을 매개하는 역할을 하도록 배치된다. 기타 세린 프로테아제는 막 결합될 수 있고 유사한 방식으로 작용할 수 있다. 기타 세린 프로테아제는 분비된 것이다. 많은 세린 프로테아제는 세포 표면 수용체와의 결합시 이의 활성을 발휘하므로, 세포 표면에서 작용한다. 세포 표면 단백질분해는 각종 세포성 기능들을 매개하는 생물학적 활성 단백질의 생성 기전이다.

분비된 및 트랜스막 세린 프로테아제를 포함한 세린 프로테아제는 신생물 발생과 진행에 관여하는 과정에 밀접한 영향을 끼쳐왔다. 이들 프로테아제의 정확한 역할이 아직 밝혀지진 않았지만, 세린 프로테아제 및 이의 억제제는 종양 진행과 관계가 있는, 암 세포 침입, 전이적 확산 및 종양의 혈관신생에 있어서의 분해 작용을 포함한 많은 세포내 및 세포외 생리학적 과정의 조절에 관여한다. 프로테아제는 세포외 매트릭스(ECM)의 분해에 관여하고 조직 리모델링을 유발시키며, 암 침입과 전이에 필요한 것으로 여겨진다. 몇몇 프로테아제의 활성 및/또는 발현이 종양 진행 및 발생과 상관이 있는 것으로 밝혀졌다.

예를 들면, 상피 암 및 정상 조직[참조: Takeucuhi et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11054-61]에서

발현되는 막-유형 세린 프로테아제 MTSP1(매트립타제로서 명명되기도 함)[참조: 미국 특허 제5,972,616호로부터의 서 열 1 및 2; 및 진뱅크 승인번호 제AF118224호; (1999) J. Biol. Chem. 274: 18231-18236; U. S. Patent No. 5,792,616; Takeuchi (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 11054-1161]이 동정되었다. 매트립타제는 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP)의 한 유형인 주요 젤라티나제(미국 특허 제5,482,848호 참조)로서 사람 유방암 세포에서 최초로 동정되었다. 이는 유방암 전이에 관여하는 것으로 보고되었다. 매트립타제는 또한, 사람 위장관 및 전립선에서 높은 활성 및/또는 발현 수준으로 각종 상피 조직에 발현된다. MTSP3, MTSP4, MTSP6으로 명명된 MTSPs가 국제공개공보 제WO 01/57194호(PCT 국제출원 제PCT/US01/03471호)에 보고되었다.

칼리크레인-유사 세린 프로테아제인 전립선-특이적 항원(PSA)은 세포외 매트릭스 당단백질 피브로넥틴 및 라미닌을 분해시키고, 전립선 암 세포에 의한 침입을 촉진시키는 것으로 간주되었다[참조: Webber et al. (1995) Clin. Cancer Res. 1: 1089-94]. PSA 단백질분해 활성을 PSA-특이적 모노클로날 항체로 차단시키면, PSA를 고수준으로 분비시키는 LNCaP 사람 전립선 암종 세포에 의한 재구성된 기저막 마트리겔(Matrigel)의 침입이 시험관 내에서 용량-의존적으로 저하된다.

간암 세포에서 동정된 세포 표면 세린 프로테아제인 헵신(hepsin)은 난소 암에서 과발현된다[참조: Tanimoto et al. (1997) Cancer Res., 57: 2884-7]. 헵신 전사체는 암종 조직에 풍부한 것으로 여겨지며, 정상 난소를 포함한 정상 성인 조직에서는 거의 발현되지 않는다. 헵신은 난소 종양에서 빈번히 과발현되기 때문에, 난소 종양 세포의 침입 과정과 성장 능력에 있어 후보 프로테아제가 될 수 있 다고 제안된 바 있다.

정상 상피 세포-특이적 1(NES1)로 명명된 세린 프로테아제-유사 유전자가 동정되었다[참조: Liu et al., Cancer Res., 56:3371-9(1996)]. NES1 mRNA의 발현이 모든 정상 및 불멸화된 비종양성 상피 세포주에서 관찰되지만, 대다수의 사람 유방암 세포주는 이의 발현이 현저히 감소되거나 거의 발현되지 않는 것으로 보인다. 성장 인자 활성을 조절하는 것으로 공지된 폴리펩티드에 대한 NES1의 구조적 유사성 및 NES1 발현과 유방 종양발생(oncogenesis)과의 음성적 상관관계는 상기 프로테아제-유사 유전자 생성물이 종양형성을 억제하는데 있어서 직접 또는 간접적인 역할을 한다는 것을 제시해준다.

따라서, 트랜스막 및 기타 세린 프로테아제 및 기타 프로테아제는 종양의 병인론과 병원성과 관계가 있는 것으로 여겨진다. 상기 과정에서의 이들의 역할을 더 명확히하고 부가의 트랜스막 프로테아제를 동정할 필요가 있다. 따라서, 본 발명의 목적은 종양형성 및/또는 발암의 조절에 관여하거나 이에 참여하는 세린 프로테아제 단백질 및 이러한 프로테아제를 암호화하는 핵산을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 상기 프로테아제 및 이러한 프로테아제를 암호화하는 핵산을 사용하는 예후, 진단 및 치료학적 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

발명의 요약

본원에는 프로테아제 도메인(예를 들어, 5, 6, 12 및 13 참조)를 포함하는 CVSP14(이의 프로테아제 도메인 포함)로 명명되는 단백질이 제공된다. CVSP14는 분비된 세린 프로테아제이다. CVSP14는 안드로겐-독립적 전립선 종양에서 고도로 발현되고, 기타 종양에서 발현된다. 따라서, 이는 프로테아제로서 종양 진행에 관여할 수 있다. 이의 기능적 활성을 통하여, 이는 치료학적 또는 진단적 표적일 수도 있다. 발현된 단백질 또는 이의 지모겐(zymogen) 형태의 발현 및/또는 활성화(또는 발현 또는 활성화의 수준 저하)를 이용하여 암과 암 치료법을 모니터할 수 있다. 예를 들면, 상기 단백질의 발현을 이용하여 전립선 암과 전립선 암 치료법을 모니터할 수 있다.

세린 프로테아제 계열에는, 비-종양 세포와는 상이한 수준으로 종양 세포에서 활성화 및/또는 발현되는 구성원; 및 종양 세포에서의 이에 대한 기질이 비-종양 세포와 상이하거나 또는 세린 프로테아제(SP)의 특이성 또는 활성을 변화시키는 세포로부터의 구성원이 포함된다. 본원에서 CVSP14로서 명명된, 본원에 제공된 세린 프로테아제는 분비된 프로테아제이다. 프로테아제 도메인 및 완전한 길이의 단백질(지모겐 및 활성화 형태 포함), 및 이의 용도가 또한 제공된다. 스플라이스 변이체에 의해 암호화된 단백질이 또한 제공된다. 상기 단백질 및 프로테아제 도메인을 암호화하는 핵산 분자가 또한 제공된다. CVSP14의 프로테아제 도메인이 서열 6에 제시되어 있고; 완전한 길이의 단백질의 서열이 서열 13에 제시되어 있다. 암호화하는 핵산 분자의 서열은 서열 5 및 12에 각각 제시되어 있다.

CVSP14는 분비된 단백질로서 발현되고, 세포 표면 수용체와 결합하여 세포-표면 결합된 프로테아제로서 작용하는데, 예를 들어, 이에 결합함으로써 또는 막-결합되거나 수용체-결합된 단백질과 이량체화 또는 다량체화함으로써 작용한다.

또한, 본원에는 SP 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및 암호화된 단백질이 제공된다. 특히, 동물로부터의 CVSP14를 암호화하는 핵산 분자(이의 스플라이스 변이체 포함)가 제공된다. 암호화된 단백질이 또한 제공된다. 또한, 이의 기능성 도메인이 제공된다. 예를 들면, SP 프로테아제 도메인, 이의 일부분, 및 이의 뮤테인은 설치류, 예를 들면, 마우스 및 랫트; 가금류, 예를 들면, 닭; 반추류, 예를 들면, 염소, 소, 사슴, 양; 양(羊) 동물, 예를 들면, 돼지; 및 사람을 포함하지만 이에 제한되지 않는 동물 SP로부터 유래된 것이다.

본원에 제공된 방법 및 검정에 사용하기 위한 프로테아제 도메인은 이본쇄 활성화 생성물을 생성시키는 활성화로부터 비롯된 것이 아니라, 일본쇄 폴리펩티드(여기서, N-말단은 서열 ↓ILGG를 포함한다)이다. 이러한 폴리펩티드가 활성화로부터 비롯된 것이 아니어서 이본쇄 형태가 아니긴 하지만, 이는 단백질분해(촉매) 활성을 나타낸다. 이들 프로테아제 도메인 폴리펩티드는 CVSP14의 활성을 조절하는 제제를 스크리닝하기 위한 검정에 사용된다.

이러한 검정이 또한 본원에 제공된다. 예시적 검정에서는, CVSP14의 일본쇄, 이본쇄 활성화 형태 또는 프로테아제 도메인(이는 일본쇄 또는 이본쇄 활성화 형태이다)의 완전한 길이, 또는 이러한 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90% 이상이 공지된 기질, 전형적으로 형광적, 색소생산적 또는 검출 가능한 수준으로 표지된 기질을 단백질분해적으로 절단시키는 능력에 대한 시험 화합물의 효과를 평가한다. 단백질(완전한 길이, 또는 이의 일본쇄 또는 이본쇄 형태인 프로테아제 도메인)의 활성을 조절하는 제제, 일반적으로 화합물, 특히 작은 분자가 CVSP14의 활성 을 조절하기 위한 후보 화합물이다. 프로테아제 도메인 및 완전한 길이의 단백질을 또한 사용하여, 이본쇄 및 일본쇄 프로테아제-특이적 항체를 생성시킬 수 있다. 본원에서 제공되는 프로테아제 도메인은 예를 들면, 비-종양 세포와는 상이한 수준으로 종양 세포에서 발현되고 내피 세포상에서는 발현되지 않는, 사람을 포함하는 포유동물으로부터의 임의의 CVSP14 계열 구성원의 지모겐의 활성화를 위한 절단 부위를 N-말단으로부터 C-말단까지를 갖는 일본쇄 영역, 또는 시험관내 단백질가수분해 분석에서 일본쇄 폴리펩타이드로서 단백질가수분해 활성을 나타내는 이의 C-말단 절단된 일부분을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

또한, CVSP14의 일본쇄 프로테아제 도메인의 뮤테인, 특히 유리된(즉, 프로테아제 도메인 내의 기타 어떠한 Cys 잔기와도 디설파이드 연결을 형성하지 않는) 프로테아제 도메인 내의 Cys 잔기(서열 6 내의 잔기 제 26번)를 또 다른 아미노산 치환체, 일반적으로 관심있는 활성을 제거하지 않는 치환체로 치환된 뮤테인, 및 글리코실화 부위(들)를 제거한 뮤테인이 제공된다. 촉매 활성은 보유하고 있는 기타 치환체로 치환시킨 뮤테인이 또한 고려된다(예시적 아미노산 치환체에 대한 표 1 참조).

따라서, 본원에는 CVSP14로 명명된 세린 프로테아제 계열의 구성원, 및 이의 기능성 도메인, 특히 프로테아제(또는 촉매적) 도메인, 뮤테인, 및 이의 기타 유도체 및 동족체가 제공된다. 또한, 본원에는 CVSP14를 암호화하는 핵산이 제공된다.

CVSP14의 핵산 및 아미노산 서열이 서열 5 및 6에 제시되어 있다. 일본쇄 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분을 암호화하는 핵산 분자, 및 완전 한 길이의 CVSP14를 암호화하는 핵산 분자(서열 12 및 13)가 제공된다. 단일 아미노산 변화가 고려되는데, 예를 들면, Gly를 Arg로 대체시킨 펩티드가 제공된다. 일본쇄 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분을 암호화하는 핵산 분자, 및 완전한 길이의 CVSP14를 암호화하는 핵산 분자가 제공된다. 완전한 길이를 따라 또는 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90%를 따라 CVSP14를 암호화하는 핵산과 하이브리드화되는 핵산 분자가 제공되고, 예를 들어, 시그날 서열 또는 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분을 이용하지 않고서, 완전한 길이 또는 이의 절단된 부분을 암호화하는 핵산 분자가 제공된다. 하이브리드화는 전형적으로, 적어도 낮은, 일반적으로 적어도 중간정도, 및 종종 높은 엄격성 조건하에 수행한다.

부가적으로, CVSP14와 특이적으로 결합하여 이의 활성을 억제시키는 항체가 본원에 제공된다. 단백질 또는 프로테아제 도메인(이의 일본쇄 및/또는 이본쇄 형태 포함)과 특이적으로 결합하는 항체가 포함된다. 항체로는 이본쇄 특이적 항체, 및 일본쇄 특이적 항체 및 중화 항체가 있다. CVSP14, 특히 일본쇄 프로테아제 도메인, 지모겐 및 활성화 형태와 특이적으로 결합하는 항체가 또한 본원에 제공된다. CVSP14의 이본쇄 및/또는 일본쇄 형태와 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다. 이러한 항체에는 프로테아제 도메인의 이본쇄 또는 일본쇄 형태 및/또는 완전한 길이의 단백질과 특이적으로 결합하는 항체가 포함된다.

CVSP14 및 CVSP14를 암호화하는 핵산 분자를 사용한 예후, 진단, 치료학적 스크리닝 방법이 본원에 추가로 제공된다. 또한, CVSP14를 암호화하는 불활성화 유전자를 보유하고 비-천연 또는 천연 프로모터의 조절하에 CVSP14를 암호화하는 유전자를 보유하고 있는 형질전환된 비-사람 동물이 제공된다. 이러한 동물은 종양 개시, 성장 및/또는 진행의 동물 모델에 유용하다.

본원에서는 폐, 전립선, 결장 및 유방암과 같은 특정의 종양 또는 암 세포에서 발현되는 세린 프로테아제(SP) 계열의 구성원이 제공된다. 특히, 본원에서는 CVSP14가 폐 암종, 백혈병 및 경부 암종 뿐만 아니라 특정의 정상 세포 및 조직에서 발현되는 것으로 제시된다(조직 특이적 발현 프로필에 대한 실시예 참조). CVSP14는 또한, 유방, 전립선 및 결장 암에 대한 마커(marker)일 수 있다.

SP는 종양 세포에서 정상 세포와는 상이한 수준으로 발현 및/또는 활성화되고 종양 세포에서 정상 세포와는 상이한 기능적 활성, 예를 들면, 이에 대한 기질 또는 조인자 변화를 나타내는 것으로 여겨지기 때문에, SP에 관심이 집중된다. CVSP14는 종양 세포에서 발현되거나 이러한 종양 세포에서 활성이기 때문에 흥미롭다. 따라서, 본원에 제공된 CVSP14는 특정 종양에 대한 진단용 마커로서 작용할 수 있다. 활성화된 CVSP14의 수준은 전립선, 자궁, 폐 또는 결장 암 또는 백혈병 또는 기타 암의 진단지표이다.

또한, 본원에서는 CVSP14의 활성을 조절하는 방법 및 CVSP14의 활성을 억제하고, 길항시키고, 효능화시키거나 그 밖에 것을 포함하여 CVSP14의 활성을 조절하는 화합물을 스크리닝하는 방법이 본원에 제공된다. 특히 관심있는 것은 해당 단백질의 촉매적 부분을 포함하는 CVSP14의 프로테아제 도메인이다.

CVSP14 폴리펩티드(이의 스플라이스 변이체가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다), 및 CVSP, 및 이의 도메인, 유도체 및 동족체를 암호화하는 핵산이 본원에 제공된다. CVSP14의 지모겐 형태를 활성화시킴으로써 발생시킨 N-말단을 함유하는 일본쇄 프로테아제 도메인이 또한 제공된다. 프로테아제 도메인에 대한 절단 부위는 아미노산 52(R↓IGGS)에 있다(서열 12 및 13 참조).

또한, 본원에 제공된 임의의 핵산 분자를 함유하는 플라스미드가 제공된다. 이러한 플라스미드를 함유하는 세포가 또한 제공된다. 상기 세포에는 세균 세포, 효모 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 동물 세포가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 플라스미드 및 세포 이외에도, 암호화된 폴리펩티드를 발현시키는 방법이 제공된다. 프로테아제 도메인을 발현시키기 위해서는, 시그날 서열을 암호화하는 핵산을 제거한다. 이 단백질을 봉입체에서 발현시킨다. 이어서, 상기 CVSP14 프로테아제 도메인을 상기 봉입체로부터 분리시키고, 이를 적당한 재폴딩이 일어나는 조건하에 처리한다. 따라서, 활성 CVSP14 프로테아제 도메인을 생성시키는 방법이 또한 제공된다.

또한, 상기 언급된 세포에 의해 CVSP14를 발현시키는 조건하에 상기 세포를 성장시키고, 이와 같이 발현된 CVSP14 폴리펩티드를 회수함으로써, CVSP14를 생성시키는 방법이 제공된다. 기타 CVSP14를 발현하는 핵산을 분리시키는 방법이 또한 제공된다.

또한, CVSP14 폴리펩티드를 발현시키는 세포, 일반적으로 진핵 세포, 예를 들면, 포유동물 세포 및 효모 세포가 제공된다. 분비된 단백질이 결합될 수 있는 상기 세포를 약물 스크리닝 검정에 사용하여, CVSP14 폴리펩티드의 활성을 조절해주는 화합물을 동정한다. 이들 검정에는 시험관내 결합 검정, 및, 예를 들어, 프 로-성장 인자의 활성화를 통하여, CVSP14 또는 이의 절단 생성물에 의해 직접 또는 간접적으로 매개된 시그날 변환을 평가하는 전사-이용된 검정이 포함된다.

추가로, CVSP14 및 CVSP14를 암호화하는 핵산 분자를 사용한 예후, 진단 및 치료학적 스크리닝 방법이 본원에 제공된다. 특히, 이러한 예후, 진단 및 치료학적 스크리닝 방법은 폐 암종, 결장 선암종 및 난소 암종과 같은 암 또는 종양을 예방 또는 치료하거나, 또는 이를 예방 또는 치료하는데 유용한 제제를 발견하는데 사용된다.

또한, CVSP14의 활성을 조절하는 화합물을 스크리닝하기 위한 방법이 제공된다. 해당 화합물을 CVSP14 또는 이의 프로테아제 도메인 및 CVSP14에 대한 기질과 접촉시킴으로써, 화합물을 동정한다. 해당 화합물의 부재하에서 절단된 기질의 양과 비교해서, 해당 화합물의 존재하에서 절단된 기질의 양 변화가 이러한 화합물이 CVSP14의 활성을 조절해주는지를 지시해준다. 상기 화합물은 추가의 분석용으로 선별되거나 또는 CVSP14의 활성을 조절하는데 사용하기 위해 선별되는데, 예를 들면, 억제제 또는 효능제로서 선별된다. 상기 화합물은 또한, CVSP14 또는 이의 촉매적 활성 부분과 결합하는 세포를 기질과 접촉시킴으로써 동정할 수 있다.

또한, CVSP14의 활성 조절제, 특히 본원에 제공된 스크리닝 방법에 따라서 수득된 조절제가 본원에 제공된다. 이러한 조절제는 암 질환 및 기타 신생물성 질환을 치료하는데 사용할 수 있다.

약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제 중의, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인 및/또는 완전한 길이 또는 기타 도메인을 함유하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다.

또한, CVSP14 폴리펩티드 및 일본쇄 형태 또는 활성화 형태의 CVSP14의 프로테아제 도메인을 함유하는 제품이 제공된다. a) 포장 재료; b) 폴리펩티드(또는 이를 암호화하는 핵산), 특히 이의 일본쇄 프로테아제 도메인; 및 c) 상기 제품이 CVSP14 폴리펩티드의 활성 조절제를 동정하기 위한 검정에 사용하기 위한 것임을 나타내는 표지를 함유하는 제품이 본원에 제공된다.

a) CVSP14 폴리펩티드 또는 일본쇄 형태의 프로테아제 도메인; 및 b) 직접 또는 링커를 통하여 CVSP에 연결된 표적화제를 함유하는 접합체가 본원에 제공되며, 상기 표적화제는 i) 상기 접합체의 친화성 분리 또는 정제, ii) 표면에 대한 접합체의 부착, iii) 접합체의 검출, 또는 iv) 선택된 조직 또는 세포로의 표적화된 전달을 촉진시킨다. 이러한 접합체는 이에 연결된 다수의 제제를 함유할 수 있다. 접합체는 화학적 접합체일 수 있으며, 융합 단백질일 수 있다.

또 다른 양태에서, 표적화제는 단백질 또는 펩티드 단편이다. 이러한 단백질 또는 펩티드 단편은 단백질 결합 서열, 핵산 결합 서열, 지질 결합 서열, 폴리사카라이드 결합 서열 또는 금속 결합 서열을 포함할 수 있다.

피검자에게서 비정상적 수준의 CVSP14를 검출하는 것을 특징으로 하는, 질병 또는 장애의 진단 방법이 제공된다. 이

러한 방법은 CVSP14의 DNA, RNA, 단백질 또는 기능적 활성 수준을 측정함으로써 실시할 수 있다. 질병이나 장애가 없는 유사 샘플(또는 기타 적합한 대조군)에서 발견되는 CVSP14의 DNA, RNA, 단백질 또는 기능적 활성 수준과 비교해서, CVSP14의 DNA, RNA, 단백질 또는 기능적 활성 수준의 증감은, 피검자 또는 기타 관련된 적합한 모든 대조군에서의 상기 질병 또는 장애의 존재에 대한 지표이다.

조합물이 본원에 제공된다. 이러한 조합물은 a) CVSP14의 활성 억제제; 및 b) 항암 치료제 또는 항암제를 포함할 수 있다. 상기 CVSP14 억제제와 항암제는 단일 약제학적 조성물에 제형화시키거나 또는 각각을 별개의 약제학적 조성물에 제형화시킬 수 있다. CVSP14 억제제는 프로테아제 도메인과 특이적으로 결합하는 항체와 같은 CVSP14에 대한 항체 또는 이의 단편 또는 결합 부분, CVSP14 생성 억제제, 또는 CVSP14 막-국재화 억제제 또는 CVSP14 활성화 억제제일 수 있다. 기타 CVSP14 억제제에는 CVSP14 또는 이의 일부분, 특히 프로테아제 도메인 부분을 암호화하는 안티센스 핵산 또는 이본쇄 RNA(dsRNA), 예를 들면, RNAi; 이종 뉴클레오티드 서열이 삽입되어 이종 서열이 암호화된 CVSP14 또는 이를 암호화하는 유전자의 생물학적 활성을 불활성화시키는 CVSP14를 암호화하는 유전자의 적어도 일부분을 암호화하는 핵산이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 CVSP14를 암호화하는 유전자의 일부분은 전형적으로 이종 서열과 플랭킹되어, CVSP14를 암호화하는 게놈성 유전자와의 동종 재조합을 증대시킨다.

또한, 유효량의 CVSP14 억제제를 포유동물에게 투여함으로써 종양 또는 암을 치료 또는 예방하는, 포유동물에서 종양 또는 암을 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 치료 또는 예방에 사용된 CVSP14 억제제는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 투여된다. 치료되는 포유동물은 사람일 수 있다. 상기 치료 또는 예방 방법은 항암 치료제 또는 항암제를, CVSP14 억제제 투여와 동시에 또는 투여후에 또는 투여 전에 투여하는 것을 부가적으로 포함할 수 있다.

또한, CVSP14의 내인성 유전자가 동종 재조합 또는 기타 재조합 사건이나 해당 동물 또는 이의 자손의 삽입성 돌연변이유발에 의해 결실 또는 불활성화된 재조합 비-사람 동물이 제공된다. CVSP14의 유전자가 이러한 유전자의 천연 프로모터가 아니거나 비-사람 동물 내의 유전자의 천연 프로모터가 아닌 프로모터의 조절하에 있거나, 또는 CVSP14를 암호화하는 핵산이 비-사람 동물에 대한 이종성이고 프로모터가 천연 프로모터 또는 비-천연 프로모터이거나 CVSP14가 염색체외 요소, 예를 들면, 플라스미드 또는 인공 염색체 상에 존재하는 재조합 비-사람 동물이 본원에 제공된다. 특히 비-천연 프로모터의 제어 하에 있거나 외인성 요소, 예를 들면, 플라스미드 또는 인공 염색체 상에 존재하는, CVSP14를 암호화하는 유전자를 보유하고 있고 CVSP14를 암호화하는 불활성화 유전자를 보유하고 있는 형질전환된 비-사람 동물이 본원에 부가적으로 제공된다.

또한, 종양 세포에서 발현되거나 활성인 CVSP14에 의해 활성화되는 프로드럭, 특히 종양 세포에서의 이의 기능적 활성이 비-종양 세포에서의 기능적 활성 보다 더 큰 CVSP14에 의해 활성화되는 프로드럭을 투여함으로써 종양을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 프로드럭을 투여하면, 투여시 활성 CVSP14가 이러한 프로드럭을 절단하여 활성 약물을 종양 세포 근처로 방출시킨다. 이러한 활성 항암 약물은 종양 근처에 축적된다. 이는 CVSP14가 기타 세포와 비교해서 종양 세포에 보다 많은 양으로, 보다 높은 수준으로 또는 현저하게 발현되거나 활성인 경우에 특히 유용하다.

또한, 시험 화합물을 CVSP14의 일본쇄 형태와 이본쇄 형태 둘 다와 접촉시키고; 상기 화합물과 결합되는 형태를 결정하고, 상기 화합물이 특정 형태의 CVSP14와 결합하는 경우에는, 해당 화합물이

(i) CVSP14의 일본쇄 지모겐 형태의 활성화를 억제시키는 특성;

(ii) 이본쇄 또는 일본쇄 형태의 활성을 억제시키는 특성; 및

(iii) 해당 단백질의 이량체화를 억제시키는 특성 중의 한 가지 이상을 나타내는지를 추가로 결정함으로써, CVSP14의 일본쇄 또는 이본쇄 형태와 결합하는 화합물을 동정하는 방법이 제공된다:

상기 형태는 완전한 길이 또는 절단된 형태일 수 있는데, 이에는 R1 활성화 부위에서의 절단으로부터 비롯되거나 또는 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분의 발현으로부터 비롯된 프로테아제 도메인이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

또한, 피검자로부터 생물학적 샘플을 수득하고; 이를, CVSP14의 이본쇄 또는 일본쇄 형태와 결합하는 검출 가능한 제제에 노출시킴으로써, 피검자에서 전암성 병소, 악성 종양 또는 기타 병리학적 질환(이러한 병리학적 질환은 상기 이본쇄 또는 일본쇄 형태의 존재 또는 부재에 의해 특징지워진다)의 존재를 진단하는 방법이 제공된다.

CVSP14의 지모겐 형태의 활성화 또는 활성화된 형태의 활성을 억제시키는 제제를 투여함으로써, 종양 침입 또는 전이를 억제시키거나 또는 악성 또는 전암성 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 질환에는 유방, 자궁경부, 전립선, 폐, 난소 또는 결장 종양과 같은 질환이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

종양 진행 및/또는 치료학적 효능을 모니터하는 방법이 또한 제공된다. CVSP14 또는 이의 프로테아제 도메인의 활성화 또는 발현의 수준을 평가하는데, 이러한 수준 변화가 종양 진행 및/또는 치료법의 효능을 반영해준다. 일반적으로, 종양이 진행됨에 따라, 체 조직 또는 체액 샘플 중의 CVSP14의 양이 증가하게 되고; 효과적인 치료법은 상기 수준을 감소시킨다.

발명의 상세한 설명

A. 정의

달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 통상적으로 인식되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 달리 언급되지 않는 한, 본원 명세서 전반에 걸쳐 언급된 모든 특허, 특허원, 공개공보, 공보, 진뱅크 서열, 웹사이트 및 기타 공개문헌은 이의 전문이 본원에 참조문헌으로써 삽입된다. 본원의 용어에 대한 정의가 여러개 존재하는 경우에는, 본 섹션에서의 정의가 널리 사용된다. URL 또는 기타 확인자 또는 주소를 참조하는 경우에는, 이러한 확인자는 변할 수 있고 인터넷 상의 특정 정보는 딴것으로 바뀔 수 있지만, 이 인터넷을 검색함으로써 등가의 정보를 발견할 수 있다는 사실을 인지해야 한다. 이를 참조한 것은 이러한 정보가 입수 가능하고 대중적으로 널리 유포된 것이라는 사실을 입증해준다.

본원에 사용된 바와 같은 모든 보호 그룹, 아미노산 및 기타 화합물에 대한 약어는 달리 언급되지 않는 한, 이들의 통상적인 용법, 승인된 약어 정의, 또는 생화학 명명법에 대한 IUPAC-IUB 위원회[참조: (1972) Biochem. 11:942-944]에 따른 것이다.

본원에 사용된 바와 같은 세린 프로테아제는 세린 잔기가 단백질 또는 펩티드의 가수분해에 관여하는 각종 프로테아제 계열을 지칭한다. 이러한 세린 잔기는 촉매작용에 세린, 히스티딘 및 아스파르트산이 관여하는 촉매적 3원(triad) 기전의 일부일 수 있거나, 또는 촉매작용에 세린 및 리신이 관여하는 하이드록실/ε-아민 또는 하이드록실/α-아민 촉매적 2원(dyad) 기전의 일부일 수 있다. 특히 관심있는 것은 포유동물(사람 포함) 기원의 SP이다. 당업자는 일반적으로, 폴리펩티드의 비-필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않는다는 것을 인식하고 있다[참조: Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p. 224].

본원에 사용된 바와 같은 '트랜스막 세린 프로테아제(MTSP)'는 본원에 언급된 바와 같은 공통의 구조적 특징을 공유하고 있는 특정 계열의 트랜스막 세린 프로테아제를 지칭한다[참조: Hooper et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:857-860]. 따라서, 예를 들면, 'MTSP'에 대한 참조는 MTSP3, MTSP4, MTSP6, MTSP7, 또는 기타 모든 공급원으로부터 수득되거나, 합성적으로 제조되었거나 또는 동일한 활성을 나타내는 등가의 분자를 포함하지만, 이에 제한되지 않은 MTSP 유전자 계열에 의해 암호화된 모든 단백질을 포괄한다. 기타 MTSP에는 코린, 엔터펩티다제, 사람 기도 트립신-유사 프로테아제(HAT), MTSP1, TMPRSS2 및 TMPRSS4가 포함되지만, 이에 제 한되지 않는다. 예시적 MTSP 및/또는 이의 도메인의 암호화 핵산 분자의 서열, 및 암호화된 아미노산 서열이, 예를 들면, 미국 특허원 제09/776,191호(서열 1 내지 12, 49, 50 및 61 내지 72; PCT 국제공개공보 WO 01/57194에 상응함)에 제시되어 있다. 상기 용어는 또한, 각 구성원의 활성을 실질적으로 변화시키지 않는 아미노산 치환체를 갖는 MTSP를 포괄한다. 반드시는 아니지만 아미노산의 보존적 치환을 포함한 적합한 치환은 당업자에게 공지되어 있고, 이는 생성되는 분자의 생물학적 활성, 예를 들면, 촉매적 활성을 제거하지 않으면서 수행될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 'CVSP의 프로테아제 도메인'은 단백질분해 활성을 나타내고 키모트립신/트립신 계열 프로테아제 도메인과 상동성 및 구조적 특징을 공유하는 CVSP14의 도메인을 지칭한다. 따라서, 이는 적어도, 표준 시험관내 검정에 의해 평가된 바와 같은 단백질분해 활성을 나타내는 도메인의 최소 부분이다. 당업자는 이러한 프로테아제 도메인이 트립신 또는 키모트립신 폴드(fold)와 구조적으로 등가인 프로테아제 부분이라는 것을 인지하고 있다. 이러한 프로테아제 도메인 및 이의 촉매적 활성 부분이 본원에서 고려된다. 또한, 일본쇄 형태로서 촉매적으로 작용하는 이의 가장 작은 단편을 포함하는, 절단된 형태의 프로테아제 도메인이 제공된다.

본원에 사용된 바와 같은 CVSP의 촉매적 활성 도메인은 프로테아제 도메인을 지칭한다. CVSP의 프로테아제 도메인에 대한 의미는 해당 단백질의 일본쇄 형태에 대한 의미가 포함된다. 이본쇄 형태 또는 둘 다가 의도된 경우에는, 또한 이와 같이 명시된다. 각 단백질의 지모겐 형태는 일본쇄가고, 이는 활성화 절단에 의해 활성 이본쇄 형태로 전환된다.

본원에 사용된 바와 같은 CVSP14의 프로테아제 도메인은 본원에서 언급될 때마다,

서열 5에 제시된 뉴클레오티드의 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드;

서열 5에 제시된 뉴클레오티드 서열에 낮은, 중간정도 또는 높은 엄격성 조건하에 하이브리드화되는 뉴클레오티드

서열에 의해 암호화된 폴리펩티드;

서열 6에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 6에 제시된 아미노산의 서열과 약 60%, 70%, 80%, 90% 또는 약 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및/또는

CVSP14의 스플라이스 변이체의 프로테아제 도메인의 촉매적 활성 부분 하나 이상 또는 이의 모든 조합물을 포함한다.

CVSP14는 모든 동물, 특히 포유동물으로부터 기원된 것일 수 있고, 사람, 설치류, 가금류, 반추류 및 기타 동물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 완전한 길이의 지모겐 또는 이본쇄 활성화 형태, 또는 이본쇄 활성화 형태 또는 일본쇄 형태일 수 있는 프로테아제 도메인을 포함한, 이의 모든 도메인이 고려된다.

활성 형태란 생체내 및/또는 시험관내에서 활성인 형태를 의미한다. 본원에 사용된 바와 같은 프로테아제 도메인은 이본쇄 형태로서 존재할 수도 있다. 적어도 시험관내에서는, SP의 일본쇄 형태 및 이의 촉매적 도메인 또는 단백질분해적 활성 부분(전형적으로, 이의 C-말단 절단부)이 프로테아제 활성을 나타내는 것으로 본원에 제시된다. 따라서, SP의 프로테아제 도메인의 분리된 일본쇄 형태, 및 이 의 활성을 조절하는 제제를 동정하기 위한 시험관내 약물 스크리닝 검정에서의 이의 용도가 본원에 제공된다.

본원에 사용된 바와 같은 활성화 절단은 프로테아제 도메인의 N-말단에서의 프로테아제의 절단을 지칭한다(이러한 경우에는, R_{55} 과 L_{56} 사이의 절단을 지칭한다; 서열 12 및 13 참조). 프로테아제 도메인의 외부 Cys(이 경우, C_{37})와 프로테인 도메인 내부 Cys(이 경우, Cys_{166}) 간의 Cys-Cys 짝 형성을 통하여 절단시, 생성되는 폴리펩티드는 2개의 쇄를 갖는다(프로테아제 도메인인 'A' 쇄 및 'B' 쇄). 절단은 또 다른 프로테아제에 의해 수행하거나 또는 자가촉매적으로 수행할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 프로테아제의 이본쇄 형태는 프로테아제 도메인을 폴리펩티드의 나머지 부분인 'A' 쇄에 연결시키는, Cys_{37} 와 Cys_{166} 간의 Cys 짝 형성이 이루어진 프로테아제의 이본쇄 형태로부터 형성되는 이본쇄 형태를 지칭한다. 이본쇄 프로테아제 도메인 형태는 '폴리펩티드의 나머지 부분', 즉 'A' 쇄가 더 짧고, 적어도 Cys_{37} 까지만을 포함하는 형태 모두를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 CVSP14는 본원에서 언급될 때마다,

서열 12에 제시된 뉴클레오티드의 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드;

서열 12에 제시된 뉴클레오티드 서열에 낮은, 중간정도 또는 높은 엄격성 조건하에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드;

서열 13에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 6 또는 13에 제시된 아미노산의 서열과 약 60%, 70%, 80%, 90% 또는 약 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및/또는

CVSP14의 스플라이스 변이체의 하나 이상 또는 모든 조합물을 포함한다.

CVSP14 폴리펩티드는 서열 13에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 프로테아제 활성을 보유하고 있는 이의 보다 작은 부분이 고려된다. 이의 프로테아제 도메인이 서열 6에 제시되어 있다. CVSP의 프로테아제 도메인은 표면 루프 내의 결실과 삽입을 포함하여 구성과 크기에 있어 다양하다. 이들은 하나 이상의 활성 부위 3원을, 1차 특이성 포켓, 옥시음이온 홀 및/또는 프로테아제의 세린 프로테아제 도메인의 기타 특징을 포함하여, 보존된 구조를 보유한다. 따라서, 본원의 목적상, 프로테아제 도메인은 본원에 정의된 바와 같은 CVSP의 특정 부분이고, 이는 기타 CVSP의 도메인과 상동성이다. 보다 큰 부류의 키모트립신(S1) 폴드[예를 들어, 인터넷 접근 가능한 MEROPS 데이터 베이스 참조]와 함께, CVSP 프로테아제 도메인은 높은 수준의 아미노산 동일성을 공유한다. 활성에 필요한 His, Asp 및 Ser 잔기가 보존된 모티프에 존재한다. 활성화 부위(이의 절단으로 인해, 이본쇄 형태의 프로테아제 도메인의 N-말단이 생성된다)는 보존적 모티프를 가지며, 이는 용이하게 동정할 수 있다.

관심있는 CVSP에는 비-종양 세포와는 상이한 수준, 전형적으로 더 높은 수준으로 종양 세포에서 활성화 및/또는 발현되는 것; 및 종양 세포에서의 이에 대한 기질이 비-종양 세포에서의 기질과 상이하거나, 또는 기질, 조인자 또는 수용체에 대해 상이하거나 또는 CVSP의 활성 또는 특이성을 변화시키는 세포로부터 유래된 것이 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 사람 단백질은 모든 대립유전자성 변이체 및 보존적 변이체(단, 이들은 기타 포유동물에서 발견되는 변이체가 아니다)을 포함한, 사람의 게놈 내에 존재하는 핵산(예: DNA)에 의해 암호화된 것이다.

본원에 사용된 바와 같은 'SP의 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분을 암호화하는 핵산'은 언급된 일본쇄 프로테아제 도메인 또는 이의 활성 부분만을 암호화하는 핵산을 지칭하는 것으로 간주되어야 하며, 연속 서열로서 SP의 기타 인접 부분을 암호화하는 것은 아니다.

본원에 사용된 바와 같은 촉매적 활성은 세린 프로테아제로서의 SP의 활성을 지칭한다. SP의 기능은 종양의 개시, 성장 또는 진행과의 관련성 또는 이의 증진을 포함한, 종양 생물학에서의 이의 기능을 지칭하고, 이는 또한 시그날 변환에 관여한다. 촉매적 활성은 선택된 기질의 단백질분해를 검출해주는 시험관내 단백질분해 검정에서 평가된 바와 같은 프로테아제로서의 SP의 활성을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 지모겐은 단백질분해 효소의 불활성 전구체이다. 이러한 전구체는 일반적으로, 활성 형태보다 더 크긴 하지만, 반드시 그럴 필요는 없다. 세린 프로테아제를 참조하면, 지모겐은 촉매적 및 자가촉매적 절단을 포함한 특이적 절단, 또는 성숙한 활성 효소를 생성시키는 활성화 조인자의 결합에 의해 활성 효소로 전환된다. 따라서, 지모겐은 활성화제의 작용에 의해 단백질분해 효소로 전환되는 효소적 불활성 단백질이다.

본원에 사용된 바와 같은 '질병 또는 장애'는, 예를 들어, 감염 또는 유전적 결함으로부터 비롯되고, 확인 가능한 수준의 증상을 특징적으로 나타내는 유기체의 병리학적 질환을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 신생물은 비정상적인 새로운 성장을 지칭하므로, 종양과 동일한 것을 의미하고, 이는 양성 또는 악성일 수 있다. 과다형성(hyperplasia)과는 달리, 신생물성 증식은 본래의 자극이 없는 경우에도 지속된다.

본원에 사용된 바와 같은 신생물성 질병은 종양 발생, 성장, 전이 및 진행을 포함한, 암과 관련된 모든 장애를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 암은 모든 유형의 악성 종양에 의해 유발된 질병에 대한 일반적인 용어를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은, 종양에 적용되는 바와 같은 악성은 성장 제어와 위치적 제어를 상실하면서 전이 능력을 나타내는 1차 종양을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 항암제(이는 '항종양제 또는 항신생물제'와 상호교환적으로 사용된다)는 항암 치료에 사용된 모든 제제를 지칭한다. 이들에는, 단독으로 사용되거나 기타 화합물과 조합하여 사용되는 경우에, 신생물성 질병, 종양 및 암과 연관된 진단학적 마커 또는 임상적 증상을 경감, 감소, 개선 또는 예방하거나, 이러한 증상들의 완화 상태를 제공 또는 유지시킬 수 있고, 본원에 제공된 방법, 조합물 및 조성물에 사용될 수 있는 모든 제제가 포함된다. 항신생물제의 비-제한적인 예에는 항-혈관형성제, 알킬화제, 항대사물, 특정의 천연 생성물, 백 금 배위 착물, 안트라센디온, 치환된 우레아, 메틸하이드라진 유도체, 부신피질 억제제, 특정 호르몬, 길항제 및 항암 폴리사카라이드가 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 스플라이스 변이체는 하나 이상의 mRNA 유형을 초래하게 되는 게놈성 핵산(예: DNA)의 1차 전사체의 차별적 프로세싱에 의해 생성된 변이체를 지칭한다. SP의 스플라이스 변이체가 본원에 제공된다.

본원에 사용된 바와 같은 혈관형성 과정(angiogenesis)은 종양과 연관된 혈관신생을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 새로운 혈관계의 정착 및 유지(혈관신생)에 직접적으로 또는 간접적으로 관여하는 과정 전체를 광범위하게 포괄한다.

본원에 사용된 바와 같은 항-혈관형성 치료제 또는 항-혈관형성제는 단독으로 사용되거나 기타 치료 또는 화합물과 조합하여 사용된 경우에, 바람직하지 않은/않거나 조절할 수 없는 혈관형성 과정과 연관된 진단학적 마커 또는 임상적 증상을 경감, 감소, 개선 또는 예방하거나, 이러한 증상들의 완화 상태를 제공 또는 유지시킬 수 있는 모든 치료학적 섭생 및 화합물을 지칭한다. 따라서, 본원의 목적상, 항-혈관형성제는 혈관계의 정착 또는 유지를 억제시키는 제제를 지칭한다. 이러한 제제에는 항종양제, 및 바람직하지 않은 혈관형성 과정과 연관된 기타 장애, 예를 들면, 당뇨병성 망막증, 재발 협착증, 과증식성 장애 등을 치료하기 위한 제제가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

본원에 사용된 바와 같은 항-혈관형성제가 아닌 항종양제는 혈관형성 과정을 억제함으로써 주로 작용하는 것이 아닌 항종양제를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 프로-혈관형성제는 혈관계의 정착 또는 유지를 증 진시키는 제제이다. 이러한 제제에는 심장 발작 및 뇌졸증을 포함한 심혈관계 장애를 치료하기 위한 제제가 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 바람직하지 않고/않거나 제어할 수 없는 혈관형성 과정은 혈관형성 과정 자극인자의 영향이 혈관형성 억제인자의 영향을 능가하는 병리학적 혈관형성 과정을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 결핍성 혈관형성 과정은 비정상적 혈관형성 과정을 초래하는 정상적 혈관형성의 결함 또는 혈관형성 과정의 부재 또는 실질적인 감소가 존재하는 장애와 연관된 병리학적 혈관형성 과정을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 SP 단백질의 프로테아제 도메인은 단백질분해 활성을 나타내는 SP의 프로테아제 도메인을 지칭한다. 따라서, 이는 적어도, 표준 시험관내 검정에 의해 평가된 바와 같은 단백질분해 활성을 나타내는 단백질의 최소 부분이다. 이는 본원에서, 일본쇄 형태 뿐만 아니라 이본쇄 활성화 형태(여기서, 이본쇄 형태가 의도된 경우에는, 이와 같이 인지될 것이다)를 지칭한다. 프로테아제 도메인의 예에는 프로테아제 활성을 나타내기에 적어도 충분한, 서열 6에 제시된 아미노산의 서열(서열 5의 뉴클레오티드에 의해 암호화됨) 부분이 포함된다.

또한, 시험관내 단백질분해 검정에서 단백질분해 활성을 나타내고 CVSP14 폴리펩티드의 완전한 길이의 프로테아제 도메인과 60%, 70%, 80%, 90% 또는 약 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는 폴리펩티드, 또는 이의 완전한 길이를 따라 또는 이러한 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90% 이상을 따라, 특히 중간정도, 일반적으로 높은 엄격성 조건하에, 프로테아제 도메인을 암호화하는 핵산과 하이브리드화 되는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자가 고려된다.

프로테아제 도메인의 경우, N-말단에서의 잔기가 활성에 결정적일 수 있다. CVSP14 프로테아제의 일본쇄 형태의 프로테아제 도메인이 촉매적으로 활성인 것으로 본원에 제시된다. 따라서, 프로테아제 도메인은 일반적으로, 이의 활성을 위해 N-말단 아미노산을 필요로 하고; C-말단 부분은 절단시킬 수 있다. 제거될 수 있는 양은 촉매적 절단을 평가하는 시험관내 검정에서 프로테아제 활성을 알아보기 위해 해당 폴리펩티드를 시험함으로써 실험적으로 결정할 수 있다.

따라서, 프로테아제 활성을 보유하고 있는, 프로테아제 도메인의 보다 작은 부분, 특히 일본쇄 도메인이 고려된다. 이러한 보다 작은 변형물은 프로테아제 도메인의 C-말단 절단된 변형물이다. 프로테아제 도메인은 표면 루프 내의 결실물과 삽입물을 포함하여 구성과 크기에 있어 다양하다. 이러한 도메인은 한 가지 이상의 구조적 특징, 예를 들면, 활성 부위 3원을 포함한 보존적 구조, 1차 특이성 포켓, 옥시아니온 홀 및/또는 프로테아제의 세린 프로테아제 도메인의 기타 특징을 나타낸다. 따라서, 본원의 목적상, 프로테아제 도메인은 본원에 정의된 바와 같은 CVSP14의 일본쇄 부분이지만, 이는 키모트립신 또는 트립신의 프로테아제 도메인과 유사하거나 상동성인 서열이 잔존해 있고 이의 구조적 특징에 있어 상동성이다. 상기 폴리펩티드는 일본쇄로서의 단백질분해 활성을 나타낸다.

본원에 사용된 바와 같은 상동성이란 핵산 서열 동일성이 약 25% 이상, 예를 들면, 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%인 것을 의미한다. 필요한 경우에는, % 상동성이 명시될 것이다. 용어 '상동성' 및 '동일성'은 종종 상호교환적으 로 사용된다. 일반적으로, 가장 높은 순서의 매치가 수득되도록 서열이 정렬된다[참조: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073]. 서열 동일성에 의해, 보존된 아미노산의 수를 표준 정렬 알고리듬 프로그램에 의해 결정하고, 이를 각각의 공급업자에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티(default gap penalty)와 함께 사용한다. 실질적으로 상동성인 핵산 분자는 관심있는 핵산 분자의 완전한 길이를 따라 또는 이러한 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90%를 따라, 전형적으로 중간정도의 엄격성 또는 고도의 엄격성 조건하에 하이브리드화될 것이다. 이와 같이 하이브리드화되는 핵산 분자 내의 코돈 대신 축퇴성 코돈을 함유하는 핵산 분자가 또한 고려된다.

임의의 2개의 핵산 분자가 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 '동일한' 뉴클레오티드 서열을 가지는지의 여부는, 예를 들어, 문헌[참조: Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]에서와 같은 디폴트 파라미터를 사용하여, 'FAST A' 프로그램과 같은 공지된 컴퓨터 알고리듬을 사용하여 결정할 수 있다[기타 프로그램에는 GCG 프로그램 패키지(참조: Devereus, J. et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA(참조: Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073)이 포함된다]. 예를 들면, 기관(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 기능을 이용하여 동일성을 결정할 수 있다. 기타 시판용 또는 공개적으로 입수 가능한 프로그램에는 DNAStar 'MegAlign' 프로그램(Madison, WI) 및 위스콘신 대학의 유전학 컴퓨터 그룹(UWG) 'Gap' 프로그램(Madison WI)이 포함된다. 단백질 및/또는 핵산 분자의 % 상동성 또는 % 동일성은, 예를 들어, GAP 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정할 수 있다[참조: Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443, as revised by Smith and Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482]. 간략하게 설명하면, GAP 프로그램은 2개의 서열중 더 짧은 서열에서의 기호 총 수로 나눈 유사한 정렬된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 유사성으로 규정한다. GAP 프로그램에 대한 디폴트 파라미터는 (1) 문헌[참조: Schwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)]에 기재된 바와 같이, 문헌(Gribskov et al. (1986) N

ucl. Acids Res. 14:6745)의 가중 비교 매트릭스 및 단항 비교 매트릭스(동일성에 대해서는 1의 값을 함유하고 비-동일성에 대해서는 0의 값을 함유한다)를 포함하고; (2) 각 갭에 대해서는 3.0의 페널티, 및 각 갭 내의 각 기호에 대해서는 부가의 0.10 페널티를 포함하며; (3) 말단 갭에 대해서는 페널티를 포함하지 않을 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 용어 '동일성'은 시험 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 참조 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 간의 비교를 나타낸다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 '90% 이상 동일한'은 참조 폴리펩티드에 기준하여 90 내지 99.9%의 % 동일성을 지칭한다. 90% 이상의 동일성은, 예를 들어, 100개 아미노산 길이의 시험 폴리뉴클레오티드와 참조 폴리뉴클레오티드를 비교한다고 가정하면, 시험 폴리펩티드 중의 10% 이하(즉, 100개 중의 10개)의 아미노산이 참조 폴리펩티드와 상이하다는 사실을 지시해준다. 시험 폴리뉴클레오티드와 참조 폴리뉴클레오티드 간에 유사한 비교를 수행할 수 있다. 이러한 차이는 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐 무작위로 분포된 점 돌연변이로서 나타낼 수 있거나, 또는 이는 허용 가능한 최대 길이, 예를 들면, 10/100 아미노산 차이(대략 90% 동일성)까지 다양한 길이의 하나 이상의 위치에 밀집될 수 있다. 차이는 핵산 또는 아미노산 치환 또는 결실로서 규정된다. 약 85 내지 90% 이상의 상동성 또는 동일성 수준에서는, 해당 결과가 상기 프로그램 및 갭 파라미터 세트와 독립적이어야 하고; 이러한 높은 수준의 동일성은 종종 소프트웨어에 의존하지 않고서도 용이하게 평가할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 프라이머는 2개 이상, 전형적으로 3개 이상의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드(이로부터 프라이머 신장 생성물의 합성이 개시될 수 있다)를 함유하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 합성을 수행하기 위한 실험 조건으로는 뉴클레오시드 트리포스페이트, 및 중합 및 신장용 제제, 예 를 들면, DNA 폴리머라제가 존재해야 하고, 적합한 완충제, 온도 및 pH가 존재해야 한다.

본원에 사용된 바와 같은 동물에는 염소, 소, 사슴, 양, 설치류, 돼지 및 사람을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 어떠한 동물도 포함된다. 비-사람 동물은 본원에 고려되는 동물로서 사람을 제외한 것이다. 본원에 제공된 SP는 모든 공급원, 동물, 식물, 원핵생물 및 진균으로부터 유래된 것이다. 대부분의 CVSP14는 포유동물 기원을 포함한 사람 기원의 것이다.

본원에 사용된 바와 같은 유전자 치료법은 이종 핵산(예: DNA)을, 이러한 치료법이 요망되는 장애 또는 질환이 있는 포유동물, 특히 사람의 특정 세포, 즉 표적 세포 내로 전달하는 것을 포함한다. 상기 핵산(예: DNA)는, 이종 핵산(예: DNA)이 발현되고 이에 의해 암호화된 치료학적 생성물이 생성되도록 하는 방식으로, 선택된 표적 세포 내로 도입시킨다. 또 다른 한편, 상기 이종 핵산(예: DNA)은 치료학적 생성물을 암호화하는 DNA의 발현을 특정 방식으로 매개할 수 있거나, 치료학적 생성물의 발현을 직접적으로 또는 간접적으로 특정 방식으로 매개하는 생성물(예: 펩티드 또는 RNA)을 암호화할 수 있다. 유전자 치료법은 또한, 결함있는 유전자를 대체시키거나 또는 해당 핵산이 도입되는 세포 또는 포유동물에 의해 생성된 유전자 생성물을 보충시킨 유전자 생성물을 암호화하는 핵산을 전달하는데 사용될 수도 있다. 이와 같이 도입된 핵산은 포유동물 숙주 내에서는 정상적으로 생성되지 않거나 또는 치료학적 유효량으로 또는 치료학적으로 유용한 시간에는 생성되지 않는 치료학적 화합물, 예를 들면, 이의 성장 인자 억제제, 또는 이의 종양 괴사 인자 또는 억제제, 예를 들면, 이에 대한 수용체를 암호화할 수 있다. 치료학적 생성물을 암호화하는 상기 이종 핵산(예: DNA)은 해당 생성물 또는 이의 발현을 증강 또는 변화시키기 위해, 병에 걸린 숙주의 세포 내로 도입하기에 앞서 변형시킬 수 있다. 유전자 치료법은 또한, 유전자 발현의 억제제 또는 기타 조절인자를 전달하는 것을 포함할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 이종 핵산은 이를 발현시킨 세포에 의해서는 생체내에서 정상적으로 생성되지 않거나 또는 전사, 해독 또는 기타 조절 가능한 생화학적 과정에 영향을 미침으로써 내인성 핵산(예: DNA)의 발현을 변화시키는 매개인자를 암호화하거나 이를 매개시키는 단백질 및 핵산(DNA가 RNA를 암호화하는 경우)이다. 이종 핵산(예: DNA)은 외래 핵산(예: DNA)으로서 지칭될 수도 있다. 당업자가 이를 발현시킨 세포와 이종이거나 또는 이에 대해 외래로서 인식 또는 간주하는 어떠한 핵산(예: DNA)도 본원에서 이종 핵산으로써 포함되며, 이종 핵산은 내재적으로 발현되기도 하는 외인적 부가된 핵산을 포함한다. 이종 핵산의 예에는 추적 가능한 마커 단백질, 예를 들면, 약물 내성이 부여된 단백질을 암호화하는 핵산; 치료학적으로 유효한 물질, 예를 들면, 항암제, 효소 및 호르몬을 암호화하는 핵산; 및 기타 유형의 단백질, 예를 들면, 항체를 암호화하는 핵산(예: DNA)이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이종 핵산에 의해 암호화된 항체는, 이러한 이종 핵산을 도입시킨 세포의 표면 상에서 분비 또는 발현될 수 있다. 이종 핵산은 일반적으로, 이것이 도입되는 세포에 내재하고 있는 것이 아니라, 또 다른 세포로부터 수득하거나 합성적으로 제조한 것이다. 일반적으로, 반드시 그럴 필요는 없 지만, 상기 핵산은 이것이 발현되는 세포에 의해 정상적으로 생성되지 않는 단백질 및 RNA를 암호화한다.

따라서, 본원의 이종 핵산 또는 외래 핵산에는 게놈에서 발견되는 대응 핵산 분자(예: DNA)와 정확히 동일한 배향 또는 위치에 존재하지 않는 핵산 분자가 포함된다. 이는 또한, 또 다른 유기체 또는 종(즉, 외인성)으로부터의 핵산 분자를 지칭할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 치료학적으로 유효한 생성물은 이종 핵산을 숙주 내로 도입할 때, 상기 핵산, 전형적으로는 DNA에 의해 암호화되는 생성물로서, 이는 발현되어 선천성 또는 후천성 질병의 증상 증상들을 개선 또는 제거하거나

또는 상기 질환을 치료한다.

본원에 사용된 바와 같이, 폴리펩티드가 본질적으로 프로테아제 도메인으로 구성된다는 언급은 해당 폴리펩티드의 SP 부분만이 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분이라는 것을 의미한다. 이러한 폴리펩티드는 부가의 비-SP-유래된 아미노산 서열을 임의로 포함할 수 있고 일반적으로 포함할 것이다.

본원에 사용된 바와 같은 암 또는 종양 치료제 또는 종양제는 단독으로 사용되거나 기타 치료 또는 화합물과 조합하여 사용된 경우에, 결함있는 혈관형성 과정과 연관된 진단학적 마커 또는 임상적 증상을 경감, 감소, 개선 또는 예방하거나, 이러한 증상들의 완화 상태를 제공 또는 유지시킬 수 있는 모든 치료학적 섭생 및/또는 화합물을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 도메인은 해당 분자의 기타 부분과는 구조적 및/또 는 기능적으로 별개인 분자, 예를 들면, 단백질 또는 이를 암호화하는 핵산의 특정 부분을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 프로테아제는 단백질 또는 펩티드의 가수분해를 촉매하는 효소를 지칭한다. 이에는 지모겐 형태 및 이의 활성화 형태가 포함된다. 명확히 설명하면, 프로테아제는 모든 형태를 지칭하고, 특정한 형태가 구체적으로 명시될 것이다. 본원의 목적상, 프로테아제 도메인에는 SP 단백질의 프로테아제 도메인의 일본쇄 및 이본쇄 형태가 포함된다. CVSP14의 경우에는, 프로테아제 도메인에 이러한 프로테아제 도메인의 이본쇄 형태가 포함되기도 한다.

본원에 사용된 바와 같은 핵산에는 DNA, RNA 및 이의 동족체(이에는 단백질 핵산(PNA) 및 이의 혼합물이 포함된다)이 포함된다. 핵산은 일본쇄 또는 이본쇄일 수 있다. 검출 가능한 표지, 예를 들면, 형광성 표지 또는 방사성 표지로 임의로 표지시킨 프로브 또는 프라이머를 언급할 경우, 일본쇄 분자가 고려된다. 이러한 분자는 전형적으로, 이들의 표적이 통계상 유일한 것이 되도록 하는 길이이거나 또는 특정 라이브러리를 프로빙 또는 프라이밍하기 위한 낮은 복사수(전형적으로 5 미만, 일반적으로 3 미만)이다. 일반적으로, 프로브 또는 프라이머는 관심있는 유전자와 동일하거나 이에 상보적인 14, 16 또는 30개 이상의 연속하는 서열을 함유한다. 프로브 및 프라이머는 길이가 10, 20, 30, 50, 100개 이상의 핵산일 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, SP의 단편 또는 일부분을 암호화하는 핵산은 SP의 언급된 단편 또는 일부분만을 암호화하고 SP의 기타 인접 부분은 암호화하지 않는 핵산을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같이, 이종 핵산을 뉴클레오티드의 조절성 및 효과인자 서열, 예를 들면, 프로모터, 인핸서(enhancer), 전사 및 해독 중지 부위, 및 기타 시그날 서열에 작동적으로 연결한다는 것은 이러한 핵산(예: DNA)과 상기 뉴클레오티드 서열 간의 상관관계를 지칭하는 것이다. 예를 들면, 이종 DNA를 프로모터에 작동적으로 연결한다는 것은 이러한 DNA와 프로모터 간의 물리적 상관관계를 지칭하는데, 여기서는 판독 프레임 내에서 상기 DNA를 특이적으로 인식하고, 이와 결합되며 이를 전사하는 RNA 폴리머라제에 의해 상기 DNA의 전사가 상기 프로모터로부터 개시된다. 따라서, 작동적으로 연결되거나 작동적으로 연합된다는 것은 핵산(예: DNA)과 뉴클레오티드의 조절성 및 효과인자 서열, 예를 들면, 프로모터, 인핸서, 전사 및 해독 중지 부위, 및 기타 시그날 서열과의 기능적 상관관계를 지칭한다. 예를 들면, DNA를 프로모터에 작동적으로 연결한다는 것은 이러한 DNA와 프로모터 간의 물리적 및 기능적 상관관계를 지칭하는데, 여기서는 상기 DNA를 특이적으로 인식하고, 이와 결합되며 이를 전사하는 RNA 폴리머라제에 의해 상기 DNA의 전사가 상기 프로모터로부터 개시된다. 발현 및/또는 시험관내 전사를 최적화하기 위해서는, 여분의 잠재적인 부적절한 대체 해독 개시(즉, 출발) 코돈, 또는 전사 또는 해독 수준에서 발현을 방해하거나 저하시킬 수 있는 기타 서열을 없애기 위해 해당 클론의 5' 비-해독된 부분을 제거, 부가 또는 변화시키는 것이 필요할 수 있다. 또 다른 한편, 컨센서스(consensus) 리보솜 결합 부위[참조: Kozak J. Biol. Chem. 266:19867-19870 (1991)]를 출발 코돈의 5' 바로 앞에 삽입할 수 있고 이는 발현을 증강시킬 수 있다. 이러한 변형의 요망(또는 필요성)은 실험적으로 결정할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같이, 안티센스 올리고뉴클레오티드와 관련하여, RNA의 적어도 일부분에 상보적인 서열이란, 일반적으로 중간정도 또는 높은 엄격성 조건하에 RNA와 하이브리드화할 수 있기에 충분히 상보적이어서, 안정한 이중체를 형성하는 서열을 의미하는데, 이본쇄 SP 안티센스 핵산의 경우에는, 상기 이중체 DNA의 일본쇄(dsDNA)을 시험할 수 있거나 또는 삼중체 형성을 평가할 수 있다. 하이브리드화하는 능력은 상보성 정도 및 안티센스 핵산의 길이에 좌우된다. 일반적으로, 하이브리드화하는 핵산 길이가 더 길수록, RNA를 암호화하는 SP와의 염기 불일치가 더 많아지는데, 이는 안정한 이중체(또는 삼중체)를 여전히 형성하여 함유할 수 있다. 당업자는 하이브리드화된 복합체의 융점을 결정하는 표준 과정을 사용함으로써 관용 불일치 정도를 확인할 수 있다.

본원의 목적상, 아미노산 치환은 SP 및 이의 프로테아제 도메인 어느 것에서도 이루어질 수 있는데, 단 생성되는 단백질은 프로테아제 활성을 나타내야 한다. 뮤테인은 보존적 아미노산 치환 및 비-보존적 아미노산 치환을 수행함으로써 만들 수 있다. 예를 들면, 단백질의 특성을 목적하는 바 대로 변화시키는 아미노산 치환을 수행할 수 있다. 한 양태에서는, 폴리펩티드의 분해를 방지하는 돌연변이를 수행할 수 있다. 많은 프로테아제가 염기성 잔기, 예를 들면, R

및 K 다음을 절단시키기 때문에, 이러한 절단을 제거하기 위해, 상기 염기성 잔기를 비-염기성 잔기로 대체시킨다. 억제제와 프로테아제가 상호작용하는 부위에서 비-보존적 변화를 수행함으로써, 촉매적 활성은 보유시키면서 상기 프로테아제와 억제제와의 상호작용을 차단시킬 수 있다. 촉매적 활성은 변화시키지 않으면서 수용체 결합성을 변화시킬 수 있다.

고려된 아미노산 치환에는 단백질분해 활성을 없애지 않은 보존적 치환, 예를 들면, 표 1에 제시된 바와 같은 치환이 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이, 단백질의 특성을 변화시키는 치환, 예를 들면, 절단 부위 또는 기타 부위의 제거가 또한 고려되는데, 이러한 치환은 일반적으로 비-보존적이지만, 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있다.

아미노산의 적합한 보존적 치환은 당업자에게 공지되어 있고, 이는 일반적으로, 생성되는 분자의 생물학적 활성, 예를 들면, 효소 활성을 변화시키지 않으면서 이루어질 수 있다. 당업자는 일반적으로, 폴리펩티드의 비-필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않는다는 것을 인식하고 있다[참조: Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p. 224]. 또한, SP의 촉매적 활성 단편, 특히 일본쇄 프로테아제 부분이 상기 정의 내에 포함된다. 보존적 아미노산 치환은 예를 들어, 다음과 같은 표 1에 제시된 것에 따라서 이루어진다:

[표 1]

최초 잔기	보존적 치환
Ala(A)	Gly; Ser, Abu
Arg(R)	Lys, Orn
Asn(N)	Gln; His
Cys(C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu(E)	Asp
Gly(G)	Ala; Pro
HIs(H)	Asn; Gln
Ile(I)	Leu; Val; Met; Nle; Nva
Leu(L)	Ile; Val; Met; Nle; Nv
Lys(K)	Arg; Gln; Glu
Met(M)	Leu; Tyr; Ile; Nle; Val
오르니틴	Lys; Arg
Phe(F)	Met; Leu; Tyr
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Nle; Nv

기타 치환 또한, 허용될 수 있으며, 이는 실험적으로 결정할 수 있거나 또는 공지된 보존적 치환에 따라서 결정할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 Abu는 2-아미노부티르산이고, Orn은 오르니틴이다.

본원에 사용된 바와 같이, 본원에 제시된 각종 아미노산 서열에 존재하는 아미노산은 널리 공지된 3개 문자 또는 1개 문자 약어에 따라서 확인된다. 각종 DNA 단편에 존재하는 뉴클레오티드는 당업계에 통상적으로 사용되고 있는 표준 단일 문자 명칭에 따라 지명된다.

본원에 사용된 바와 같이, 본원에 기재된 뉴클레오티드 서열에 기초한 프로브 또는 프라이머에는 서열 5의 뉴클레오티드의 10, 14개 이상, 전형적으로 16개 이상의 연속되는 서열, 및 서열 5의 뉴클레오티드의 30, 50 또는 100개 이상의 연 속되는 서열의 프로브가 포함된다. 독특한 하이브리드화를 위한 프로브 또는 프라이머의 길이는 관심있는 게놈의 복잡성에 대한 함수이다.

본원에 사용된 바와 같이, 특정한 약제학적 조성물을 투여함으로써 특정 장애 증상을 개선시키는 것은 영구적 또는 임시적이든지, 지속적 또는 일시적이든지 간에, 상기 조성물의 투여에 기인하거나 또는 이와 연관될 수 있는 모든 증상 저하를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 안티센스 폴리뉴클레오티드는 mRNA에 상보적인 뉴클레오티드 염기의 합성 서열 또는 이본쇄 DNA의 센스 쇄를 지칭한다. 센스 폴리뉴클레오티드와 안티센스 폴리뉴클레오티드를 적당한 조건하에 혼합하면, 두 분자가 결합되거나 하이브리드화된다. 이들 폴리뉴클레오티드가 mRNA와 결합(하이브리드화)하는 경우에는, 단백질 합성(해독)이 억제된다. 이들 폴리뉴클레오티드가 이본쇄 DNA와 결합하는 경우에는, RNA 합성(전사)이 억제된다. 이와 같은 해독 및/또는 전사 억제로 인해, 센스 쇄에 의해 암호화된 단백질의 합성이 억제된다. 안티센스 핵산 분자는 전형적으로, 표적 핵산과 특이적으로 결합하는데 충분한 수의 뉴클레오티드, 일반적으로 5개 이상의 연속되는 뉴클레오티드, 종종 14, 16 또는 30개 이상의 연속되는 뉴클레오티드, 또는 관심있는 유전자를 암호화하는 핵산 분자, 예를 들면, SP의 일본쇄 프로테아제 도메인을 암호화하는 핵산의 암호화 부분에 상보적인 변형된 뉴클레오티드를 함유한다.

본원에 사용된 바와 같은 어레이(array)는 3개 이상의 구성원을 함유하는, 요소들(예: 항체)의 집합을 지칭한다. 주소매김 가능한 어레이(addressable array)는 어레이의 구성원이, 전형적으로 고체상 지지체 상에서의 위치에 의해 확인 가능한 것이다. 따라서, 일반적으로, 어레이 구성원은 고체 상의 표면 위에 별개의 확인 가능한 위치에 고정화된다.

본원에 사용된 바와 같은 항체는 천연이든지 또는 부분 또는 완전히 합성적으로 생성되든지 간에, 면역글로불린을 지칭하는데, 이에는 항체의 특이적 결합 능력을 보유하고 있는 이의 모든 유도체가 포함된다. 따라서, 항체에는 면역글로불린 결합 도메인과 상동성이거나 실질적으로 상동성인 결합 도메인을 갖는 모든 단백질이 포함된다. 항체에는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 포함한, 모든 면역글로불린 청구물이 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 항체 단편은 완전한 길이의 항체의 특이적 결합 능력의 적어도 일부를 보유하는, 완전한 길이 보다 짧은 모든 항체 유도체를 지칭한다. 항체 단편의 예에는 Fab, Fab', $F(ab)_2$, 일본쇄 Fvs(svFV), FV, dsFV 디아보디(diabody) 및 Fd 단편이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 단편은 예를 들어, 디설파이드 브릿지에 의해, 다중 쇄가 함께 연결될 수 있다. 항체 단편은 일반적으로 약 50개 이상의 아미노산, 전형적으로 200개 이상의 아미노산을 함유한다.

본원에 사용된 바와 같은 Fv 항체 단편은 비공유 상호작용에 의해 연결된 1개의 가변 경쇄 도메인과 1개의 가변 중쇄 도메인(V_H)으로 구성된다.

본원에 사용된 바와 같은 dsFV는 V_H-V_L 쌍을 안정화시키는, 공학적으로 처리 된 분자간 디설파이드 결합을 갖는 Fv를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 $F(ab)_2$ 단편은 면역글로불린을 pH 4.0-4.5에서 펩신으로 분해시킴으로써 발생된 항체 단편인데, 이는 등가의 단편을 생성시키기 위해 재조합적으로 제조될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 Fab 단편은 면역글로불린을 파파인으로 분해시킴으로써 발생된 항체 단편인데, 이는 등가의 단편을 생성시키기 위해 재조합적으로 제조될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 scFVs는 어떠한 순서로든 폴리펩티드 링커에 의해 공유적으로 연결된 가변 중쇄(V_H) 및 가변 경쇄(V_L)를 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 이러한 링커의 길이는 2개의 가변 도메인이 실질적인 간섭없이 브릿지되도록 선택된다. 링커에는 용해도를 증가시키기 위해 전반에 걸쳐 분산된 몇몇 Glu 또는 Lys 잔기를 갖는 $(Gly\text{-}Ser)_n$ 잔기가 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 사람화 항체는 사람에게 투여될 때 면역 반응을 유발시키지 않도록 사람의 아미노산 서열을 포함하도록 변형시킨 항체를 지칭한다. 이러한 항체의 제조 방법은 공지되어 있다. 예를 들면, 모노클로날 항체를 발현하는 하이브리도마를 재조합 DNA 기술에 의해 변형시켜, 비-가변 영역의 아미노산 조성이 사람 항체에 기초하는 항체를 발현시킨다. 이러한 영역을 동정하기 위한 컴퓨터 프로그램이 고안되었다.

본원에 사용된 바와 같은 디아보디는 이량체성 scFV이고; 디아보디는 전형적 으로, scFVs 보다 더 짧은 펩티드 링커를 가지며, 이는 일반적으로 이량체화된다.

본원에 사용된 바와 같이, 재조합 DNA 방법을 사용하는 재조합 수단에 의한 생성이란, 클론화된 DNA에 의해 암호화된 단백질을 발현하기 위해 분자 생물학 분야에서 널리 공지된 방법을 사용하는 것을 의미한다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 '평가한다'는 것은 해당 샘플 내에 존재하는 SP 또는 이의 도메인의 활성에 대한 절대치를 수득하고, 또한 이러한 활성 수준을 지시해주는 지수, 비율, 퍼센트, 가시값 또는 기타 값을 수득한다는 점에서 정량적 및 정성적으로 결정하는 것을 의미한다. 평가는 직접 또는 간접적일 수 있으며, 실제적으로 검출된 화학 종은 단백질분해 생성물 그 자체일 필요는 없지만, 이는 예를 들어, 이의 유도체 또는 몇몇 추가 물질일 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 생물학적 활성은 화합물, 조성물 또는 기타 혼합물을 생체내 투여할 때 야기되는 생리학적 반응 또는 화합물의 생체내 활성을 지칭한다. 따라서, 생물학적 활성은 상기 화합물, 조성물 및 혼합물의 치료학적 효과 및 약제학적 활성을 포괄한다. 생물학적 활성은 이러한 활성을 시험 또는 사용하도록 고안된 시험관내 시스템에서 관찰될 수 있다. 따라서, 본원의 목적상, 루시퍼라제의 생물학적 활성은 기질의 산화시 빛을 발생시키는 이의 옥시게나제 활성이다.

본원에 사용된 바와 같은 기능적 활성은 완전한 길이의(완전한) 단백질과 연관된 한 가지 이상의 활성을 나타내는 폴리펩티드 또는 이의 일부분을 지칭한다. 기능적 활성에는 생물학적 활성, 촉매적 또는 효소적 활성, 항원성(항-폴리펩티드 항체와 결합하기 위해 특정 폴리펩티드와 경쟁하거나 이와 결합하는 능력), 면역원 성, 다량체를 형성하는 능력, 폴리펩티드에 대한 수용체 또는 리간드와 특이적으로 결합하는 능력이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

본원에 사용된 바와 같은 접합체는 하나 이상의 SP(CVSP14 포함), 특히 이의 일본쇄 프로테아제 도메인, 및 하나 이상의 표적화제를 포함하는, 본원에 제공된 화합물을 지칭한다. 이들 접합체에는 재조합 수단에 의해 융합 단백질로서 생성된 것; 화학적 수단, 예를 들면, 설프하이드릴 그룹에 대한 커플링을 통한 화학적 커플링에 의해 생성된 것; 및 하나 이상의 SP 또는 이의 도메인을 직접적으로 또는 링커를 통하여 간접적으로 표적화제에 연결시키는 기타 방법에 의해 생성된 것이 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 표적화제는 접합체가 세포 표면 수용체와 특이적으로 결합하도록 해주는 모든 잔기, 예를 들면, 단백질 또는 이의 유효 부분이며, 이는 상기 접합체 또는 이의 SP 부분을 내재화시킬 수 있다. 표적화제는 또한, 예를 들어, 접합체의 친화적 분리 또는 정제; 접합체를 특정 표면에 부착시키는 것; 또는 접합체 또는 이러한 접합체를 함유하는 복합체의 검출을 증진 또는 촉진시키는 것일 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 항체 접합체는 표적화제가 항체인 접합체를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 분자의 유도체 또는 동족체는 이러한 분자의 변형된 형태로부터 유래된 부분을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같이, 특정 질병을 치료하기 위한 화합물의 유효량은 질 병과 연관된 증상을 개선시키거나 몇몇 방식으로 이러한 증상을 저하시키는데 충분한 양이다. 이러한 양은 단일 투여량으로 투여될 수 있거나 또는 유효한 섭생에 따라서 투여할 수 있다. 상기 양은 질병을 치료할 수 있지만, 전형적으로 이는 질병 증상을 개선시킬 목적으로 투여된다. 목적하는 증상 개선을 달성하기 위해서는 반복적으로 투여할 필요가 있다.

본원에 사용된 바와 같은 등가물은 2개의 핵산 서열을 인용하는 경우에는, 문제의 2개 서열이 동일한 아미노산 서열 또는 등가의 단백질을 암호화한다는 것을 의미한다. 등가물이 2개의 단백질 또는 펩티드를 인용하기 위해 사용되는 경우, 이는 2개의 단백질 또는 펩티드가 해당 단백질 또는 펩티드의 활성이나 기능은 실질적으로 변화시키지 않는 아미노산 치환(예를 들면, 상기 표 1에 제시된 바와 같은 보존적 변화가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다)만을 갖는 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는다는 것을 의미한다. 등가물이 특성을 지칭하는 경우에는, 이러한 특성은 동일한 정도로 존재할 필요는 없지만(예를 들면, 2개의 펩티드는 동일한 유형의 효소적 활성을 상이한 수준으로 나타낼 수 있다), 이러한 활성은 통상적으로 거의 동일하다. 상보적이란 용어가 2개의 뉴클레오티드 서열을 참조하여 사용된 경우, 이는 2개의 뉴클레오티드 서열이, 전형적으로 대립된 뉴클레오티드 상에 25%, 15%, 5% 미만 또는 0%의 불일치를 나타내면서 하이브리드화할 수 있다는 것을 의미한다. 필요한 경우에는, 상보성의 %가 명시될 것이다. 전형적으로, 2개 분자는 이들이 고도의 엄격성 조건하에 하이브리드화되도록 선택된다.

본원에 사용된 바와 같이, 단백질의 활성 또는 유전자 또는 핵산의 발현을 조절하는 제제는 상기 단백질의 활성을 감소 또는 증가 또는 변화시키거나, 또는 몇몇 방식으로는, 세포 중의 상기 핵산의 발현을 상향 조절 또는 하향 조절 또는 변화시킨다.

본원에 사용된 바와 같은 SP의 활성 억제제는 SP의 생성, 해독후 변형(들), 돌연변이 또는 막 국재화를 억제 또는 저하시키는 모든 물질; 또는 시험관내 스크리닝 검정에서 SP, 특히 이의 일본쇄 형태의 단백질분해 효능을 저하시키거나 이를 방해하는 모든 물질을 포괄한다.

본원에 사용된 바와 같이, 신생물성 질병을 치료 또는 예방하는 방법은 이러한 질병의 특징적인 사항으로서 나타나는 모든 증상, 예를 들면, 종양, 이의 전이, 종양의 혈관화 또는 기타 파라미터를 감소, 개선 또는 예방하거나, 이러한 증상의 완화 상태를 제공 또는 유지시키는 것을 의미한다. 이는 또한, 신생물성 질병 및 전이의 현저한 특징이 상기 치료에 의해 없어지거나, 감소되거나 또는 방지될 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 현저한 특징의 비-제한적 예를 들면, 기저막 및 근접 세포외 매트릭스가 제어할 수 없는 수준으로 분해되고; 내피 세포가 새로이 작용하는 모세혈관 내로 이동, 분할 및 조직화하며; 이러한 새로이 작용하는 모세혈관이 영구화되는 것이다.

본원에 사용된 바와 같은 접합체의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르 또는 기타 유도체에는 이러한 유도체화에 공지된 방법을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 제조될 수 있고, 실재적인 독성 효과를 나타내지 않으면서 동물이나 사람에게 투여될 수 있고 약제학적으로 활성이거나 프로드럭인 화합물을 생성시키는 모든 염, 에스테르 또는 유도체가 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 프로드럭은 생체내 투여시, 생물학적, 약제학적 또는 치료학적 활성 형태로 대사 또는 전환되는 화합물이다. 프로드럭을 제조하기 위해, 약제학적 활성 화합물이 대사적 과정에 의해 재생되도록 이를 변형시킨다. 이러한 프로드럭은 약물의 대사 안정성 또는 수송 특징을 변화시키거나, 부작용 또는 독성을 은폐시키거나, 약물의 향을 증진시키거나 또는 약물의 기타 특징 또는 특성을 변화시키도록 고안될 수 있다. 생체내 약물 대사 및 약력학적 과정에 관한 지식을 이용하여, 당업자는 약제학적 활성 화합물이 공지되어 있으면, 이러한 화합물의 프로드럭을 고안할 수 있다[참조: Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392].

본원에 사용된 바와 같은, 본원에 제공된 스크리닝 방법에 의해 동정된 약물은 치료제로서 또는 치료제의 고안을 위한 선도(lead) 화합물로서 사용하기 위한 모든 후보 화합물을 지칭한다. 이러한 화합물은 작은 분자(작은 유기 분자 포함), 펩티드, 펩티드 모사체, 안티센스 분자 또는 dsRNA, 예를 들면, RNAi, 항체, 항체 단편, 재조합 항체, 및 약물 후보 또는 선도 화합물로서 제공될 수 있는 기타 화합물일 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 펩티드-모사체는 특정한 펩티드의 생물학적 활성 형태의 입체 구조 및 특정의 입체화학 특징을 모사하는 화합물이다. 일반적으로, 펩티드-모사체는 화합물의 특정의 바람직한 특성은 모사하지만, 생물학적 활성 입체 구조의 상실과 결합 파괴를 유발시키는 바람직하지 못한 특성은 모사하지 않도 록 고안된다. 펩티드-모사체는 바람직하지 못한 특성의 원인이 되는 특정 그룹 또는 결합을 바이오이소스테레(bioisostere)로 대체시킴으로써 생물학적 활성 화합물로부터 제조할 수 있다. 바이오이소스테레는 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, 메틸렌 바이오이소스테레 CH_2S가 엔케팔린 동족체에서 아미드 대체물로서 사용되었다[참조: Spatola (1983) pp. 267-357 in Chemistry and BIochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weistein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York]. 경구 투여될 수 있는 모르핀은 펩티드 엔돌핀의 펩티드-모사체인 화합물이다. 본원의 목적상, 사이클릭 펩티드가 펩티드-모사체에 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 프로모터 영역 또는 프로모터 요소는 이에 작동적으로 연결된 DNA 또는 RNA의 전사를 제어하는 DNA 또는 RNA의 절편을 지칭한다. 프로모터 영역은 RNA 폴리머라제 인식, 결합 및 전사 개시에 충분한 특이적 서열을 포함한다. 상기 프로모터 영역 부분은 프로모터로서 지칭된다. 또한, 프로모터 영역은 RNA 폴리머라제의 인식, 결합 및 전사 개시 활성을 조절하는 서열을 포함한다. 이들 서열은 시스 작용성일 수 있거나 또는 트랜스 작용성 인자에 반응성일 수 있다. 프로모터는 조절 성질에 따라서, 구성성이거나 조절성일 수 있다. 원핵생물에 사용하도록 고려된 프로모터의 예에는 박테리오파아지 T7 및 T3 프로모터가 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 수용체는 소정의 리간드에 대한 친화성을 나타내는 분자를 지칭한다. 수용체는 천연 또는 합성 분자일 수 있다. 수용체는 또한, 당 해 분야에서 항-리간드로서 지칭될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 수용체 및 항-리간드는 상호교환적이다. 수용체는 이들의 변화되지 않은 상태로 사용되거나 기타 종과의 응집체로서 사용될 수 있다. 수용체는 공유적 또는 비공유적, 또는 물리적으로 접촉시킴으로써 결합 구성원에 부착시킬 수 있는데, 이는 직접 수행하거나 특이적 결합 물질 또는 링커를 통하여 간접적으로 수행할 수 있다. 수용체의 예에는 항체, 세포막 수용체, 표면 수용체 및 내재화 수용체, (예를 들면, 바이러스, 세포 또는 기타 물질 상에서) 특이적 항원 결정기와 반응성인 모노클로날 항체 및 항혈청, 약물, 폴리뉴클레오티드, 핵산, 펩티드, 조인자, 렉틴, 당, 폴리사카라이드, 세포, 세포성 막 및 소기관이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

수용체 및 이러한 수용체를 이용한 적용 분야에는 다음이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다:

a) 효소: 항생제[리간드] 선별을 위한 표적으로서 제공될 수 있는, 미생물의 생존에 필수적인 특이적 수송 단백질 또는 효소;

b) 항체: 관심있는 항원의 에피토프와 결합하는 항체 분자 상의 리간드-결합 부위를 동정하기 위해 조사할 수 있으며; 항원성 에피토프를 모사하는 서열을 결정함으로써, 이의 면역원이 하나 이상의 상기 서열에 기초한 백신을 개발할 수

있거나 또는 자가 면역 질환에 대한 치료와 같은 치료에 유용한 화합물 또는 관련 진단제를 개발할 수 있다;

c) 핵산: 리간드(예: 단백질 또는 RNA) 결합 부위의 동정;

d) 촉매적 폴리펩티드: 하나 이상의 반응물을 하나 이상의 생성물로 전환시 키는데 관여하는 화학 반응을 증진시킬 수 있는 중합체(폴리펩티드 포함); 이러한 폴리펩티드는 일반적으로, 하나 이상의 반응물 또는 반응 중간체에 특이적인 결합 부위, 및 이러한 결합 부위에 근접한 활성 관능기를 포함하는데, 이러한 관능기는 상기 결합된 반응물을 화학적으로 변형시킬 수 있다[미국 특허 제5,215,899호 참조);

e) 호르몬 수용체: 높은 친화도로 수용체와 결합하는 리간드를 결정하는 것이 호르몬 대체 요법을 개발하는데 유용하다; 예를 들면, 이러한 수용체와 결합하는 리간드를 동정함으로써, 혈압을 제어해주는 약물을 개발할 수 있다;

f) 아편제 수용체: 뇌에서 아편제 수용체와 결합하는 리간드를 결정하는 것이 모르핀 및 관련 약물에 대해 덜-중독성인 대체제를 개발하는데 유용하다.

본원에 사용된 바와 같은 샘플은 분석물 검정이 요망되는 분석물을 함유할 수 있는 모든 것을 지칭한다. 이러한 샘플은 생물학적 샘플, 예를 들면, 생물학적 체액 또는 생물학적 조직일 수 있다. 생물학적 체액의 예로는 뇨, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 정액, 대변, 담, 뇌척수액, 눈물, 점액, 양수 등이 있다. 생물학적 조직은 통상적으로, 사람, 동물, 식물, 세균, 진균 또는 바이러스성 구조물의 구조적 물질(연결, 상피, 근육 및 신경 조직 포함) 중의 하나를 형성하는 이들의 세포간 물질과 함께 특정 종류의 세포 응집체이다. 생물학적 조직의 예로는 기관, 종양, 림프절, 동맥 및 개개 세포(들)가 포함된다.

본원에 사용된 바와 같이, 부정합율을 결정하는데 있어서의 하이브리드화 엄격성은 다음과 같다:

1) 높은 엄격성: 0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65℃

2) 중간 수준의 엄격성: 0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50℃

3) 낮은 엄격성: 0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 50℃.

당업자에게는 안정한 하이브리드를 위해 선택된 세척 단계가 공지되어 있고, 또한 SSPE의 성분이 공지되어 있다[참조: Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), vol, p.B. 13; 또한, 통상 사용된 실험적 해결책이 보고된 수 많은 카탈로그 참조]. SSPE는 pH 7.4 인산염 완충된 0.18 NaCl이다. 추가로, 당업자는 하이브리드의 안정성이 T_m [이는 나트륨 이온 농도와 온도의 함수(T_m = 81.5℃-16.6($\log_{10}$ [Na^+]) + 0.41(1% G + C)-600/l))이다]로써 결정되므로, 하이브리드 안정성에 결정적인 세척 조건에서의 유일한 파라미터는 SSPE(또는 SSC) 중의 나트륨 농도와 온도라는 것을 인식하고 있다.

또 다른 완충제, 염 및 온도를 사용하여 등가의 엄격성을 달성할 수 있다는 것을 인지해야 한다. 이로써 제한되는 것은 아니지만, 이의 예를 들면, 낮은 엄격성 조건을 이용한 과정은 다음과 같다[참조: Shilo and Weinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792 (1981)]: DNA를 함유하는 필터를 40℃에서 6시간 동안, 35% 포름아미드, 5X SSC, 50mM 트리스-HCl(pH 7.5), 5mM EDTA, 0.1% PVP, 0.1% 피콜(Ficoll), 1% BSA, 및 500μg/ml 변성된 연어 정액 DNA(10X SSC는 pH 7로 조절된 0.15M 나트륨 시트레이트 및 1.5M 염화나트륨이다)을 함유하는 용액에서 예비처리한다.

다음과 같이 변형시키면서 동일한 용액 중에서 하이브리드화를 수행한다: 0.02% PVP, 0.02% 피콜, 0.2% BSA, 100 μg/ml 연어 정액 DNA, 10%(wt/vol) 덱스트란 설페이트, 및 5-20 X 10^6 cpm ^{32}P-표지된 프로브를 사용한다. 필터를 40℃에서 18 내지 20시간 동안 하이브리드화 혼합물에서 항온처리한 다음, 2X SSC, 25mM 트리스-HCl(pH 7.4), 5mM EDTA 및 0.1% SDS를 함유하는 용액 중에서 55℃에서 1.5시간 동안 세척한다. 이러한 세척 용액을 신선한 용액으로 대체시키고, 60℃에서 1.5시간 더 항온처리한다. 필터를 건조 블롯팅시키고 자가방사법을 위해 노출시킨다. 필요한 경우, 필터를 65 내지 68℃에서 3회 세척하고 필름에 재노출시킨다. 사용될 수 있는 기타 낮은 엄격성 조건은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 교차-종 하이브리드화에 이용된 바와 같음).

이로써 제한되는 것은 아니지만, 이의 예를 들면, 적당히 엄격한 조건을 이용한 과정에는 예를 들어, 다음과 같은 적당히 엄격한 조건을 이용하는 과정이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다: DNA를 함유하는 필터를 55℃에서 6시간 동안, 6X SSC, 5X 덴하르트 용액, 0.5% SDS 및 100μg/ml 변성된 연어 정액 DNA을 함유하는 용액에서 예비처리한다. 동일한 용액 중에서 하이브리드화를 수행하고, 5-20 X 10^6 cpm ^{32}P-표지된 프로브를 사용한다. 필터를 55℃에서 18 내지 20시간 동안 하이브리드화 혼합물에서 항온처리한 다음, 1X SSC 및 0.1% SDS를 함유하는 용액 중

에서 60℃ 하에 30분 동안 2회 세척한다. 필터를 건조 블롯팅시키고 자가방사선 술을 위해 노출시킨다. 사용될 수 있는 기타 적당히 엄격한 조건은 당해 분야에 공지되어 있다. 필터의 세척은 2X SSC, 0.1% SDS를 함유하는 용액 중에서 37℃ 하에 1시간 동안 수행한다.

이로써 제한되는 것은 아니지만, 이의 예를 들면, 높은 엄격성 조건을 이용한 과정은 다음과 같다: DNA를 함유하는 필터를 65℃에서 8시간 내지 밤새, 6X SSC, 50mM 트리스-HCl(pH 7.5), 1mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, 및 500μg/ml 변성된 연어 정액 DNA로 구성된 완충액에서 예비하이브리드화한다. 필터를 100μg/ml 변성된 연어 정액 DNA 및 5 내지 20 X 10^6 cpm의 ^{32}P-표지된 프로브를 함유하는 예비하이브리드화 혼합물 중에서 65℃ 하에 48시간 동안 하이브리드화시킨다. 필터의 세척은 2X SSC, 0.01% PVT, 0.01% Ficoll 및 0.01% BSA를 함유하는 용액 중에서 37℃ 하에 1시간 동안 수행한다. 이어서, 50℃ 하에 45분 동안 0.1X SSC에서 세척한 다음, 자가방사선술로 노출시킨다. 사용될 수 있는 기타 높은 엄격성 조건은 당해 분야에 공지되어 있다.

용어 실질적으로 동일한, 또는 상동성 또는 유사한은 관련 분야의 전문가가 인지하고 있는 상황에 따라 다양하며, 이는 일반적으로, 60% 또는 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 동일하다는 것을 의미한다.

본원에 사용된 바와 같이, 생성물과 실질적으로 동일하다는 것은, 실질적으로 동일한 생성물이 해당 생성물을 대체하여 사용할 수 있을 정도로 관심있는 특성 이 충분히 변하지 않도록 충분히 유사한 것을 의미한다.

본원에 사용된 바와 같이, 실질적으로 순수하다는 것은, 순도를 평가하기 위해 당업자에 의해 사용되고 있는 표준 분석 방법, 예를 들면, 박층 크로마토그래피(TLC), 겔 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 결정된 바와 같이, 용이하게 검출 가능한 불순물을 함유하고 있지 않을 정도로 충분히 균질하거나, 또는 추가의 정제를 수행하여도, 해당 물질의 물리적 및 화학적 특성, 예를 들면, 효소적 및 생물학적 활성을 검출 가능한 수준으로 변화시키지 않을 정도로 충분히 순수한 것을 의미한다. 실질적으로 화학적으로 순수한 화합물을 제조하기 위해 화합물을 정제하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 그러나, 실질적이면서 화학적으로 순수한 화합물은 입체이성체 또는 이성체의 혼합물일 수 있다. 이러한 경우, 추가의 정제가 해당 화합물의 특이 활성을 증가시킬 수도 있다.

본원에 사용된 바와 같은 표적 세포는 생체내에서 SP를 발현하는 세포를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 시험 물질(또는 시험 화합물)은 시험관내 방법, 예를 들면, 본원에 제공된 검정에 의해 결정된 바와 같이, SP, 특히 프로테아제 도메인 또는 이의 활성에 충분한 부분을 포함하는 일본쇄 형태에 대해 효과를 발휘하는, 화학적으로 규정된 화합물(예: 유기 분자, 무기 분자, 유기/무기 분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 올리고뉴클레오티드, 지질, 폴리사카라이드, 사카라이드 또는 하이브리드, 예를 들면, 당단백질 등) 또는 화합물의 혼합물(예: 시험 화합물, 천연 추출물 또는 배양 상등액 등의 라이브러리)을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 치료제, 치료학적 섭생, 방사선보호제, 화학요법제는 당업자에게 공지되어 있는 통상적인 약물 및 약물 치료법(백신 포함)을 의미한다. 방사선치료제가 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

본원에 사용된 바와 같은 치료는 특정 질환, 장애 또는 질병의 증상이 개선되거나 유리하게 변화되는 모든 방식을 의미한다. 치료는 또한, 본원에 제공된 조성물의 모든 약제학적 용도를 포괄한다.

본원에 사용된 바와 같은 벡터(또는 플라스미드)는 이의 발현 또는 복제를 위해 이종 핵산을 세포 내로 도입하는데 사용되는 별개의 요소를 지칭한다. 벡터는 전형적으로, 에피좀(episome)으로 유지되지만 특정 유전자 또는 이의 일부분이 게놈의 염색체 내로 통합되도록 고안될 수 있다. 또한, 인공 염색체, 예를 들면, 효모 인공 염색체 및 포유동물 인공 염색체인 벡터가 고려된다. 이러한 비히클의 선택과 사용은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 발현 벡터에는 DNA 단편을 발현시킬 수 있는 조절성 서열(예: 프로모터 영역)에 작동적으로 연결된 DNA를 발현할 수 있는 벡터가 포함된다. 따라서, 발현 벡터는 적당한 숙주 세포 내로의 도입시, 클론닝된 DNA의 발현을 초래하는 재조합 DNA 또는 RNA 작제물, 예를 들면, 플라스미드, 파아지, 재조합 바이러스 또는 기타 벡터를 지칭한다. 적당한 발현 벡터는 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 진핵 세포 및/또는 원핵 세포에서 복제 가능한 것과, 에피좀으로 유지되거나 숙수 세포 게놈내로 통합되는 것이 포함된다.

본원에 사용된 바와 같은 단백질 결합 서열은 기타 단백질 또는 펩티드 서열, 일반적으로 단백질 또는 펩티드 서열 세트 또는 특정한 단백질 또는 펩티드 서 열에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 또는 펩티드 서열을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 에피토프 태그는 에피토프 태그된 단백질 또는 펩티드의 후속적인 생화학 분석 및 면역학 분석을 촉진시키기 위한, 에피토프에 상응하는 아미노산의 짧은 신장물을 지칭한다. 에피토프 태그화는 단백질-암호화 서열에 대한 에피토프 태그 서열을 적당한 발현 벡터 내에 포함시킴으로써 달성된다. 에피토프 태그된 단백질은, 이러한 태그에 대해 생성된 고도의 특이적 항체를 사용하여 친화성 정제시킬 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 금속 결합 서열은 금속 이온, 일반적으로 금속 이온 세트 또는 특정한 금속 이온과 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 또는 펩티드 서열을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 조합물은 둘 이상의 항목 간의 모든 연합물을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 조성물은 모든 혼합물을 지칭한다. 이는 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비수성 또는 이들의 모든 조합물일 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 유체는 유동할 수 있는 모든 조성물을 지칭한다. 따라서, 유체는 반-고체, 페이스트, 용액, 수성 혼합물, 겔, 로션, 크림 형태의 조성물 및 기타 조성물을 포괄한다.

본원에 사용된 바와 같은 세포성 추출물은 용해되거나 파괴된 세포로부터 제조된 제제 또는 분획을 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은 제제는 단백질 단독 또는 이의 연합 기질, 결합 파 트너 등과의 연합에 관여한 특이적 서열을 고려하지 않고 무작위로 제제를 선택한 경우에 무작위로 선택된 것으로 지칭된다. 무작위로 선택된 제제의 예는 화학적 라이브러리 또는 펩티드 조합 라이브러리, 또는 유기체의 성장 브로쓰 또는 조건을 맞춘 배지의 사용이다.

본원에 사용된 바와 같은 특정 제제는 이러한 제제의 작용과 관련하여 표적 부위 서열 및/또는 이의 입체형태를 고려하여 비-무작위에 근거하여 제제를 선택한 경우에 합리적으로 선택 또는 고안된 것으로 지칭된다. 본 실시예에 기재된 바와 같이, 서열 3 또는 서열 4를 갖는 단백질 내에 세린 프로테아제에 대한 결합 부위 및 (촉매적) 부위가 제안된다. 이들 부위를 구성하는 펩티드 서열을 활용함으로써, 제제를 합리적으로 선택하거나 합리적으로 고안할 수 있다. 예를 들면, 합리적으로 선택된 펩티드 제제는 이의 아미노산 서열이 ATP 또는 칼모둘린 결합 부위 또는 도메인과 동일한 펩티드일 수 있다.

이로써 제한되는 것은 아니지만, 본 기술 내용을 명확히 하기 위해, 상세한 설명을 다음과 같이 소구분으로 나눈다:

B. CVSP14 폴리펩티드, 이의 뮤테인, 유도체 및 동족체

SP

세린 프로테아제(SP)는 포유동물 및 기타 종에서 발견되는 단백질의 한 계열이다. SP는 본원에 기재된 바와 같은 수많은 공통의 구조적 특징을 공유하고 있다. 단백질분해성 도메인은 보존된 모티프에 존재하는 촉매적 활성에 필요한 보존된 His, Asp 및 Ser 잔기를 포함한 서열 상동성을 공유하고 있다. 이들 SP는 지모 겐으로서 합성되고, 특이적 절단에 의해 이본쇄 형태로 활성화된다.

SP 계열은 치료학적 중재에 대한 표적일 수 있고, 또한 종양 개시, 발생, 성장 및/또는 진행에 대한 진단학적 마커로서 작용할 수 있다. 논의된 바와 같이, 상기 계열의 구성원은 종양 발생, 성장 및/또는 진행에 밀접한 영향을 미치는 단백질분해 과정에 관여한다. 이러한 연관성은 이들이 세포외 매트릭스 분해 및 리모델링 및 성장 및 프로-혈관형성 인자 활성화에 있어서 단백질분해 효소로서 작용한다는 것에 기초한다. 또한, 이의 발현 수준, 또는 기질 수준 또는 이의 기질 변화 수준으로부터 비롯되는 이들의 외견상(apparent) 활성 또는 활성화 수준이 동일 조직 내의 종양 세포와 비-종양 세포에서 서로 상이하다. 따라서, 예를 들면, 이들의 활성 및/또는 발현을 조절하는 화합물을 상기 구성원과 접촉시킴으로써, 이들의 활성, 예를 들면, 이들의 단백질분해 활성, 및 시그날 변환 및/또는 발현에서의 역할을 변화시키는 프로토콜 및 치료가 종양 발생, 성장 및/또는 진행에 영향을 미칠 것이다. 또한, 몇몇 경우에는, 활성화 및/또는 발현 수준이 종양, 예를 들면, 췌장, 위, 자궁, 폐, 결장 및 경부암, 및 유방, 전립선 또는 백혈병에서 변할 수 있다.

기타 경우에, SP 단백질은 이에 대한 조인자 또는 기질의 활성 또는 발현 변화를 통해 변화된 활성을 나타낼 수 있다. 체액, 예를 들면, 혈청, 혈액, 타액, 뇌척수액, 활액 및 매트릭스액, 뇨, 땀 및 기타 체액 및 분비물 중에서 SP, 특히 프로테인 도메인을 검출하는 것은 진단학적 종양 마커로서 제공될 수 있다. 특히, 어떠한 신생물성 질병도 없는 것으로 공지된 피검자와 비교하거나 또는 동일한 피 검자로부터의 초기 샘플과 비교해서, 피검자 내에 고수준의 폴리펩티드가 검출된다는 것은 이러한 피검자에게 신생물성 질병이 있다는 것을 지시해준다.

CVSP14로 명명된 계열 구성원이 제공된다. 본원에 제공된 CVSP14는 특정 종양에서 발현 및/또는 활성화되는 세린 프로테아제이므로, 이들의 활성화 또는 발현이 종양 발생, 성장 및/또는 진행에 대한 진단학적 마커로서 제공될 수 있다는 사실이 본원에서 밝혀졌다. CVSP14는 또한, 약물 표적으로서 사용하도록 제공되고, 이는 본원에 예시된 것을 포함한 스크리닝 검정에 사용된다. 일본쇄 단백질분해성 도메인이 시험관내에서 작용할 수 있으므로, 상기 계열의 구성원의 활성을 조절하는 제제를 동정하기 위한 시험관내 검정에 유용하다는 것이 본원에 제시되어 있다. 또한, 이본쇄 형태 또는 완전한 길이 또는 이의 절단된 형태, 예를 들면, 시그날 펩티드가 제거된 형태가 상기 검정에 사용될 수도 있다.

특정 양태에서, CVSP14 폴리펩티드는 종양이 없는 피검자의 체액 내에서의 수준과는 상이한 수준으로 체액에서 검출될 수 있다. 기타 양태에서는, 상기 폴리펩티드가 종양 내에 존재하고; 이러한 폴리펩티드에 대한 기질 또는 조인자는 동일한 유형의 조직 내의 비-종양 세포에서의 발현 수준과 상이한 수준으로 발현된다.

CVSP14

실질적으로 정제된 CVSP14 지모겐, 활성화된 이본쇄 형태, 일본쇄 프로테아제 도메인 및 이본쇄 프로테아제 도메인이 제공된다. 시그날 서열을 포함한 완전한 길이의 CVSP14 폴리펩티드가 서열 12 및 13에 제시되어 있다. 시그날 서열은 발현시 또는 발현에 앞서 절단될 수 있다.

또한, CVSP14와 60%, 70%, 80%, 90% 또는 약 95% 이상의 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는, 실질적으로 정제된 단백질이 제공되는데, 여기서 % 동일성은 % 동일성을 최대화하는 표준 알고리듬과 갭 페널티를 사용하여 결정한다. 사람 CVSP14 폴리펩티드가 예시되긴 하지만, 기타 포유동물 CVSP14 폴리펩티드도 고려된다. CVSP14의 스플라이스 변이체, 특히 단백질분해적으로 활성인 프로테아제 도메인을 갖는 변이체가 본원에 고려된다.

기타 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분은 포함하지만, 서열 13에 제시된 아미노산 서열 전체는 포함하지 않는, 실질적으로 정제된 폴리펩티드가 제공된다. 이들로는, 서열 6과 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 있다.

서열 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분 또는 서열 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 프로테아제 및 이의 도메인과 약 60%, 70%, 80%, 90% 또는 약 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는, 실질적으로 정제된 CVSP14 폴리펩티드 및 이의 기능성 도메인(촉매적 활성 도메인 및 부분 포함)이 제공된다.

서열 6을 참조로 하면, 프로테아제 활성화 절단 부위는 R_{55}과 I_{56} 사이이고; 상동성에 기초한 촉매적 3원은 H_{96}, D_{146}, S_{244}이며; N_{108} VT에 잠재적 N-글리코실화 부위가 존재하고; Cys 짝형성은 C_{37}-C_{166} (이는 프로테아제 도메인을 폴리펩티드의 나머 지 부분에 연결시킨다), C_{180}-C_{250}, C_{211}-C_{229} 및 C_{240}-C_{269} 간에 있는 것으로 추정된다. 따라서, C_{166}는 이본쇄 분자로서 제공될 수도 있는 프로테아제 도메인 내의 유리 Cys이다. 그러나, 일본쇄 형태가 단백질분해적으로 활성인 것으로 본원에 제시된다.

또한, 본원에 제공된 핵산 분자에 의해 암호화되는 폴리펩티드가 제공된다. 이들 폴리펩티드에는 CVSP14 프로테아제 도메인, 또는 특이성 및 프로테아제 활성은 제거되지 않고 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 유지되거나 실질적으로 변화되지 않은 채로 유지되도록 하는 아미노산 변화를 나타내는 폴리펩티드가 포함된다. 특히, 세린 프로테아제 촉매적 도메인을 포함하고 기타 도메인을 부가적으로 포함하는, 실질적으로 정제된 포유동물 SP 단백질이 제공된다. CVSP14는 동종이량체를 형성할 수 있고, 몇몇 다른 단백질, 예를 들면, 막-결합된 단백질과 이종이량체를 형성할 수도 있다.

기능적으로 활성인 CVSP14의 도메인, 단편, 유도체 또는 동족체는 CVSP14 폴리펩티드와 연관된 한 가지 이상의 기능적 활성, 예를 들면, 세린 프로테아제 활성, 면역원성 및 항원성을 나타낼 수 있으며, 이것이 본원에 제공된다.

CVSP14 폴리펩티드의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50개 이상, 전형적으로 10 내지 15개의 아미노산을 함유하는 항원성 에피토프가 제공된다. 이들 항원성 에피토프는 예를 들어, 항체를 생성하기 위해 사용된다. 각각의 에피토프 또는 이의 조합물에 특이적 항체, 및 일본쇄 형태 및 이본 쇄 형태에 특이적인 항체가 제공된다.

CVSP14 폴리펩티드의 뮤테인 및 유도체

완전한 길이의 CVSP14, 이의 지모겐 및 활성화 형태, 및 CVSP14 프로테아제 도메인, 이의 일부분, 및 상기 폴리펩티드의 뮤테인 및 유도체가 제공된다. 상기 유도체는 설치류, 예를 들면, 마우스 및 랫트; 가금류, 예를 들면, 치킨; 반추류, 예를 들면, 염소, 소, 사슴, 양; 양(羊) 동물, 예를 들면, 돼지; 및 사람을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 동물 CVSP14에 기초한 것이다. 예를 들면, CVSP14 유도체는 이들의 서열을 치환, 부가 또는 결실에 의해 변화시킴으로써 만들 수 있다. CVSP14 유도체에는 1차 아미노산 서열로서, CVSP14의 아미노산 서열 전부 또는 일부(이에는 기능상 등가의 아미노산 잔기를 침묵(silent) 변화를 초래하는 CVSP14의 서열 내의 잔기로 치환시킴으로써 변화시킨 서열이 포함된다)를 함유하는 것이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 서열 내의 1개 이상의 아미노산 잔기가 침묵 변화를 가져다 주는 기능상 등가물로서 작용하는 유사한 극성의 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 상기 서열 내의 아미노산에 대한 치환체는 해당 아미노산이 속하는 부류의 다른 구성원 중에서 선택될 수 있다. 예를 들면, 비극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 루이신, 이소루이신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌이 포함된다. 극성의 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민이 포함된다. 양전으

로 하전된(염기성) 아미노산에는 아르기닌, 리신 및 히스티딘이 포함된다. 음으로 하전된(산성) 아미노산에는 아스파르트산 및 글루탐산이 포함된다(표 1 참조). 아미노산의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이하를 또 다른 아미노산으로 대체시킨, CVSP14의 뮤테인 또는 이의 도메인, 예를 들면, 프로테아제 도메인이 제공된다. 일반적으로, 이러한 뮤테인은 돌연변이되지 않은 단백질의 프로테아제 활성의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% 또는 90% 이상을 보유하고 있다.

1개 이상의 Cys 잔기, 특히 활성화된 이본쇄 형태에서는 짝을 형성하지만, 프로데아제 도메인 단독(즉, 프로테아제 도메인 내의 26번 위치의 잔기에서의 Cys(서열 5 및 6 참조))에서는 짝을 형성하지 않는 잔기를 임의의 아미노산, 반드시는 아니지만, 보존적 아미노산 잔기, 예를 들면, Ser으로 대체시킨 뮤테인이 고려된다. CVSP14의 뮤테인, 특히 Cys 잔기, 예를 들면, 일본쇄 프로테아제 도메인 내의 Cys를, 해당 활성을 제거하지 않는 또 다른 아미노산으로 대체시킨 뮤테인이 제공된다.

아미노산을 기타 아미노산으로 대체시킨 단백질의 뮤테인이 또한 제공된다. 이들로는 Cys 잔기를 반드시는 아니지만 전형적으로, 보존적 아미노산 잔기, 예를 들면, 세린으로 대체시킨 뮤테인이 있다. 이러한 뮤테인이 또한 본원에 제공된다. 아미노산의 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 이상을 대체시키지만, 생성되는 폴리펩티드가, 동일한 기질에 대한 변형되지 않은 형태로서 촉매적 활성의 약 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상을 보유하고 있는 뮤테인이 또한 제공된다.

프로테아제 도메인

SP의 일본쇄 형태로서 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분을 포함하는, 분리되고 실질적으로 순수한 프로테아제가 제공된다. 이러한 프로테아제 도메인은 보다 긴 단백질에 포함될 수 있고, 이러한 보다 긴 단백질은 임의로, CVSP14 지모겐이다. 일본쇄로서 CVSP14의 프로테아제 도메인을 함유하는, 분리되고 실질적으로 순수한 단일 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 본원에 제공된 CVSP14는, 전형적으로 동일한 유형의 비-종양 세포에 의해 발현되는 수준과는 상이한 수준으로 종양 세포에서 발현 또는 활성화된다. 따라서, 예를 들면, SP가 전립선 또는 난소 종양 세포에 의해 발현되는 경우(이는 전립선 또는 난소암에 대해 본원에서 관심을 갖는 것이다), 이의 발현, 활성화 정도 또는 활성 수준은 비-종양 세포에서의 수준과 상이하다. CVSP14는 폐, 결장, 전립선, 유방, 자궁, 난소 및 기타 종양 세포에서 발현된다.

SP 프로테아제 도메인에는 CVSP14의 일본쇄 프로테아제 도메인이 포함된다. 임의의 SP, 특히 CVSP14의 프로테아제 도메인인 SP의 부분을 포함하는 단백질 또는 프로테아제 도메인이 제공된다. 이러한 단백질은 또한, 기타 비-SP 아미노산 서열을 포함할 수 있지만, 프로테아제 도메인을 포함하거나, 또는 본원에 제공된 바와 같은, 프로테아제 활성을 평가하는 모든 시험관내 검정에서 촉매적 활성을 나타내기에 충분한 상기 프로테아제 도메인 부분을 포함한다. 또한, 완전한 길이의 프로테아제의 이본쇄 활성화된 형태 및 프로테아제 도메인의 이본쇄 형태가 제공된다.

한 양태에서, 실질적으로 정제된 SP 프로테아제는 이의 프로테아제 도메인 암호화 핵산이 이의 완전한 길이를 따라 또는 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90% 이상을 따라 하이브리드화되도록 하는데 적어도 중간정도, 일반적으로 높은 엄격성 조건하에, 서열 5에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 프로테아제 도메인을 함유하는 핵산 분자와 하이브리드화되는 핵산에 의해 암호화된다. 기타 양태에서는, 실질적으로 정제된 SP 프로테아제는 실질적으로 서열 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 일본쇄 폴리펩티드, 또는 이의 촉매적 활성 부분이다.

특히, 프로테아제 도메인의 예에는 본원에 제공된 검정에서 프로테아제 활성을 나타내기에 충분한, 서열 6에 제시된 아미노산 서열(서열 5의 뉴클레오티드에 의해 암호화됨)의 적어도 일부분이 포함된다.

시그날 펩티드(서열 13의 아미노산 1번 내지 25번)가 또한 제공된다. 또한, 제거된 시그날 서열을 갖는 성숙한 CVSP15 폴리펩티드가 제공된다.

다음에 기재되는 바와 같이, 시그날 서열을 갖는 프로-폴리펩티드, 성숙한 폴리펩티드 및 이의 촉매적 활성 부분, 프로테아제 도메인 및 이의 촉매적 활성 부분, 이들 단백질의 이본쇄 및 일본쇄 형태를 포함한, 모든 형태의 CVSP14가 본원에 제공되고, 이는 스크리닝 검정에 사용될 수 있으므로, 이에 특이적인 항체를 제조하는데 사용될 수 있다. 종양 세포 및 체액에서의 상기 단백질의 발현, 양 및/또는 활성화는 질병의 존재 또는 부재를 진단해줄 수 있다.

핵산 분자, 벡터 및 플라스미드, 세포 및 CVSP14 폴리펩티드의 발현

핵산 분자

뉴클레오티드 암호화 서열의 축퇴성(degeneracy)으로 인해, CVSP14 유전자와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 기타 핵산 서열을 사용할 수 있다. 이들에는, 서열 내의 아미노산 잔기를 암호화하는 상이한 코돈의 치환

에 의해 변화시킴으로써 침묵 변화를 야기하는, CVSP14 유전자 전부 또는 일부를 포함하는 뉴클레오티드 서열이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

또한, 적어도 낮은 엄격성, 중간정도의 엄격성 및/또는 높은 엄격성 조건하에, CVSP14를 암호화하는 상기 언급된 뉴클레오티드 서열과 하이브리드화되고, CVSP14의 프로테아제 도메인 및/또는 이의 완전한 길이의 단백질 또는 기타 도메인, 또는 이의 스플라이스 변이체 또는 대립유전자성 변이체를 암호화하는 핵산 분자가 제공된다. 일반적으로, 상기 분자는 하나 이상의 도메인에 대한 완전한 길이를 따라(또는 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90% 이상을 따라) 상기 조건하에 하이브리드화되고, 상기 폴리펩티드의 하나 이상의 도메인, 예를 들면, 프로테아제 도메인을 암호화한다. 특히, 이러한 핵산 분자는 (1) 프로테아제 또는 이의 기능적 활성, 예를 들면, 촉매적 활성 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유하고, (2) 다음들 중에서 선택되는, 세린 프로테아제의 하나 이상의 도메인을 암호화하는 분리된 모든 핵산 단편을 포함한다:

(a) 서열 5 또는 12에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로테아제 또는 이의 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(b) 상기 부분 또는 완전한 길이의 프로테아제를 암호화하고, 중간정도 또는 높은 엄격성 조건하에, 일반적으로 상기 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 포유동물 세포에 존재하는 mRNA 전사체에 상보적인 핵산과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열;

(c) 상기 부분 또는 완전한 길이의 개방 판독 프레임에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 세린 프로테아제 또는 이의 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(d) 상기 소단위체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 세린 프로테아제를 암호화하고, 높은 엄격성 조건하에, mRNA 전사체에 상보적인 DNA와 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열;

(e) (a) 내지 (d) 중의 어느 하나의 스플라이스 변이체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및

(f) (a) 내지 (e)의 전부 또는 일부의 축퇴성 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열.

분리된 핵산 단편은 DNA(게놈성 또는 cDNA 포함) 또는 RNA이거나 또는 기타 성분, 예를 들면, 단백질 핵산을 포함할 수 있다. 분리된 핵산은 부가의 성분, 예를 들면, 이종 또는 천연 프로모터, 및 기타 전사 및 해독 조절 서열을 포함할 수 있고, 이들 유전자는 기타 유전자, 예를 들면, 리포터(reporter) 유전자 또는 기타 지시인자 유전자, 또는 지시인자를 암호화하는 유전자에 연결될 수 있다.

본원에 제공된 CVSP14는 단백질분해 활성을 나타내는 프로테아제 도메인을 암호화하는 서열을 포함하고, 전형적으로 중간정도, 일반적으로 높은 엄격성 조건하에 일반적으로 프로테아제 도메인의 완전한 길이 또는 이러한 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90% 이상을 따라, 서열 5에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자와 하이브리드화되는 핵산에 의해 암호화된다. 스플라이스 변이체가 또 한 본원에 제공된다.

특정 양태에서는, CVSP14로 명명된 CVSP를 암호화하는 핵산이 제공된다. 특히, 상기 핵산은 서열 5에 제시된 뉴클레오티드 서열, 또는 촉매적 활성 폴리펩티드를 암호화하는 이의 일부분을 포함한다. 또한, 적어도 낮은 엄격성, 일반적으로 중간정도의 엄격성, 보다 전형적으로 높은 엄격성 조건하에, 서열 5 또는 이의 축퇴물에 하이브리드화되는 핵산 분자가 제공된다.

한 양태에서는, 분리된 핵산 단편이 높은 엄격성 조건하에, 서열 5(또는 이의 변성물)에 제시된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 핵산 분자와 하이브리드화되고, 다른 양태에서는 서열 5 및 6에 제시된 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 완전한 길이의 CVSP14가 서열 13에 제시되어 있고, 이는 서열 12 또는 이의 변성물에 의해 암호화된다.

또한, 시험관내 단백질분해 검정에서 단백질분해 활성을 지니고 CVSP14 폴리펩티드의 완전한 길이의 프로테아제 도메인과 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성을 나타내거나, 또는 특히 중간정도, 일반적으로 높은 엄격성 조건하에 이들의 완전한 길이를 따라 또는 이러한 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90% 이상을 따라, 프로테아제 도메인을 암호화하는 핵산과 하이브리드화되는 핵산 분자가 고려된다. 상기와 같이 암호화된 폴리펩티드는 일본쇄로서 프로테아제를 함유한다.

분리된 핵산은 CVSP14-암호화 서열 또는 완전한 길이의 SP-암호화 서열의 10개 이상, 25개, 50개, 100개, 150개, 또는 200개 이상의 연속되는 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 또 다른 양태에서는, 핵산의 길이가 35, 200 또는 500개 보다 적은 뉴클레오티드일 수 있다. CVSP14-암호화 핵산 분자와 하이브리드화되거나 이에 상보적인 핵산은 일본쇄 또는 이본쇄일 수 있다. 예를 들면, CVSP14-암호화 핵산의 10, 25, 50, 100 또는 200개 이상의 뉴클레오티드, 또

는 이의 전체 암호화 영역, 특히 이의 프로테아제 도메인에 상보적인 서열(구체적으로 언급하면, 이의 역 보체)을 포함하는 핵산이 제공된다. CVSP14에 대해, 완전한 길이의 단백질 또는 이의 도메인 또는 활성 단편이 또한 제공된다.

각각의 핵산 분자에 대해, 핵산은 DNA 또는 RNA 또는 PNA 또는 기타 핵산 동족체일 수 있거나, 또는 이는 비-천연 뉴클레오티드 염기를 포함할 수 있다. 또한, SP를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자가 제공된다.

프로브, 프라이머, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 dsRNA

또한, 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있고 서열 5(또는 이의 보체)에 제시된 약 10, 14, 16개 이상의 뉴클레오티드, 일반적으로 1000개 미만 또는 100개 이하의 뉴클레오티드를 함유하거나, 또는 약 30개 이상의 뉴클레오티드(또는 이의 보체)를 함유할 수 있는 올리고뉴클레오티드 또는 이의 단편; 또는 이의 완전한 길이 따라 또는 이러한 완전한 길이의 약 70%, 80% 또는 90% 이상을 따라 상기 단편 또는 올리고뉴클레오티드와 하이브리드화되는 올리고뉴클레오티드가 제공된다. 상기 단편의 길이는 이들이 사용되는 목적 및/또는 관심있는 게놈의 복잡성의 함수이다. 일반적으로, 프로브 및 프라이머는 약 500, 150, 100개 미만의 뉴클레오티드 를 함유한다.

핵산 분자로부터 유래된 프로브 및 프라이머가 제공된다. 이러한 프로브 및 프라이머는 CVSP14의 연속되는 뉴클레오티드와 동일한 8, 14, 16, 30, 100개 이상의 연속되는 뉴클레오티드를 함유한다. 프로브 및 프라이머는 검출 가능한 표지, 예를 들면, 방사성 표지 또는 형광성 태그로 임의로 표지시키거나 또는 질량 분광법 또는 기타 수단에 의해 검출하기 위해 질량 구별시킬 수 있다.

또한, CVSP14 또는 이의 일부분을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 분자의 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자가 제공된다. 이본쇄 RNA(dsRNA), 예를 들면, RNAi가 또한 제공된다.

플라스미드, 벡터 및 세포

핵산 분자를 함유하는 플라스미드 및 벡터가 또한 제공된다. 이러한 벡터를 함유하는 세포(이에는 암호화된 단백질을 발현하는 세포가 포함된다)가 제공된다. 상기 세포는 세균 세포, 효모 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포일 수 있다. 예를 들어, 암호화된 SP가 해당 세포에 의해 발현되도록 하는 조건하에 세포를 성장시키고, 이와 같이 발현된 단백질을 회수함으로써, SP 또는 이의 일본쇄 형태의 프로테아제 도메인을 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 인지된 바와 같이, CVSP14에 대해, 완전한 길이의 지모겐 및 활성화된 단백질 및 활성화된(이본쇄) 프로테아제 및 일본쇄 프로테아제 도메인이 제공된다.

다음에 논의되는 바와 같이, CVSP14 폴리펩티드, 및 이의 촉매적 활성 부분은 본래의 시그날 서열 또는 이종 시그날을 사용하여 분비된 단백질로서 발현시킬 수 있다. 또 다른 한편, 예시된 바와 같이, 상기 단백질은 세포질에서 봉입체로서 발현될 수 있고 이로부터 분리시킬 수 있다. 생성된 단백질을 처리하여 재폴딩시킬 수 있다(실시예 1 참조). 활성 프로테아제 도메인이 봉입체에서의 발현, 이로부터의 분리 및 변성에 이은 재폴딩에 의해 생성될 수 있는 것으로 본원에 제시되어 있다.

C. 종양 특이성 및 조직 발현 프로필

각 SP는 특징적인 종양 발현 프로필을 지니며; SP는 종양에서만 발현 또는 활성화되지는 않지만, 특히 특징적인 종양 조직 발현 또는 활성화 프로필을 나타낸다. 몇몇 경우, SP는 종양 세포에서의 활성이, 해당 SP의 외견상 기능적 활성을 변화시킬 수도 있는 기질 또는 조인자 또는 기타 인자 상의 변화를 통하여, 비-종양 세포에서의 활성과 상이할 수 있다. 따라서, 이들 각각은 신생물성 질병이 없는 피검자(들)와 비교해서 신생물성 질병이 있는 피검자(즉, 포유동물, 특히 사람)에서의 활성 및/또는 발현 또는 기능 수준을 통하여, 특정 종양에 대한 진단학적 마커로서 제공될 수 있다. 또한, 특정 조직에서의 활성(및/또는 발현)의 검출은 신생물성 질병의 존재 여부의 지표이다.

체액 중 순환 SP는 신생물성 질병의 존재의 지표이다. 분비된 CVSP14 또는 활성화된 CVSP14는 신생물성 질병의 존재의 지표이다. 또한, 각각의 활성 및/또는 발현 프로필을 통해, 이들은, 예를 들어, 이의 활성 조절제를 투여하거나 SP 중의 하나에 의해 특이적으로 활성화된 프로드럭을 투여함으로써 치료학적 표적으로서 작용될 수 있다.

조직 발현 프로필

CVSP14

CVSP14는 안드로겐-독립적 종양 세포주에서 고수준으로 발현된다. CVSP14 전사체가 정상적인 신장 샘플에서 검출되었다. CVSP14 시그날은 일치된 모든 신장 종양 세포에서 감소되었다. 전립선 정상/종양 cDNA 샘플 3쌍 모두에

서 약한 시그날이 검출되었다. 또한, 9개의 정상 유방 샘플 중의 3개 샘플에서 약한 시그날이 검출되었다. 7개의 자궁 종양 중의 1개에서도 약한 시그날이 검출되었지만, 이들의 정상 조직 대응물에서는 검출되지 않았다. 3개의 정상 폐 조직 중의 1개 샘플에서도 약한 시그날이 검출되었지만, 이들의 일치된 종양 샘플에서는 검출되지 않았다. HeLa 세포, 버킷트(Burkitt) 림프종 다우디 세포, 만성 골수성 백혈병 K562, 전골수구 백혈병 HL-60 세포, 흑색종 G361 세포, 폐 암종 A549 세포, 림프아구성 백혈병 MOLT-4 및 결장직장성 선암종 SW480 세포를 포함한 각종 종양 세포주로부터의 cDNA 샘플에서는 극히 약한 시그날이 관찰될 수 있다.

따라서, 특정 세포, 예를 들면, 전립선 암 세포에서의 발현이 종양 마커로서 작용할 수 있는 반면; 기타 조직, 예를 들면, 신장에서의 발현 부재가 종양 마커로서 작용할 수 있다.

D. SP 단백질 유전자의 동정 및 분리

CVSP14 폴리펩티드를 포함한 SP 폴리펩티드, 또는 이의 도메인은 단백질 정제 및 재조합 단백질 발현을 위해 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 수득할 수 있다. 목적하는 유전자를 암호화하는 핵산을 동정하는 것으로 당업자에게 공지되 어 있는 어떠한 방법도 사용될 수 있다. 당해 분야에서 이용될 수 있는 어떠한 방법을 사용해서도, SP 단백질을 암호화하는 완전한 길이의(즉, 전체 암호화 영역을 포괄하는) cDNA 또는 게놈성 DNA 클론을 수득할 수 있다. 특히, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여, 상이하게 발현되는 것으로 동정되거나 또는 종양 세포 또는 조직과 비-종양 세포 또는 조직에서 상이한 수준으로 활성화된 단백질을 암호화하는 것으로 동정된 서열, 예를 들면, 게놈 또는 cDNA 라이브러리에서 CVSP14 폴리펩티드(서열 5, 6, 12 및 13)를 암호화하는 핵산을 증폭시킬 수 있다. 이와 같이 동정된 서열의 3' 및 5' 말단 서열과 하이브리드화되는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 프라이머로서 사용하여, 적당한 공급원(예: 종양 또는 암 조직)으로부터의 핵산 샘플(RNA 또는 DNA), 전형적으로 cDNA 라이브러리로부터 서열을 PCR에 의해 증폭시킬 수 있다.

예를 들어, 퍼킨-엘머 세투스(Perkin-Elmer Cetus) 열 사이클러 및 Taq 폴리머라제(Gene Amp™)를 사용함으로써 PCR을 수행할 수 있다. 이와 같이 증폭된 DNA는 진핵성 종으로부터의 mRNA 또는 cDNA 또는 게놈성 DNA를 포함할 수 있다. PCR 반응에 사용하기 위해, 몇 가지 상이한 축퇴성 프라이머를 합성하도록 선택할 수 있다. 또한, 분리하고자 하는 핵산 동족체와 공지된 뉴클레오티드 서열 간에 다소의 뉴클레오티드 서열 유사성을 허용해줌으로써 핵산 동족체를 증폭시키기 위해(예를 들어, 사람 이외의 종으로부터 SP 단백질 서열을 수득하거나 CVSP14 폴리펩티드와 상동성인 사람 서열을 수득하기 위해), PCR 반응을 개시하는데 사용된 하이브리드화 조건의 엄격성을 다양하게 할 수 있다. 교차 종 하이브리드화의 경우에는, 낮거나 중간정도의 엄격성 조건이 사용된다. 동일한 종 하이브리드화의 경우에는, 중간정도 또는 높은 엄격성 조건이 일반적으로 사용된다. 동정된 SP 단백질 서열의 전부 또는 일부를 함유하는 핵산, 또는 SP 단백질 동족체의 전부 또는 일부를 암호화하는 핵산을 성공적으로 증폭시킨 후, 상기 절편을 분자상 클로닝 및 서열화시킬 수 있고, 이를 프로브로서 사용하여, 완전한 cDNA 또는 게놈성 클론을 분리시킬 수 있다. 이로써, 해당 유전자의 완전한 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있고, 이의 발현을 분석할 수 있으며, 기능 분석을 위한 이의 단백질 생성물을 생성시킬 수 있다. 일단 뉴클레오티드 서열이 결정되면, 개방 판독 프레임을 결정하는 것으로 당해 분야에 널리 공지된 모든 방법, 예를 들면, 뉴클레오티드 서열 분석을 위해 공개적으로 입수 가능한 컴퓨터 프로그램을 사용하여, SP 단백질 유전자 단백질 생성물을 암호화하는 개방 판독 프레임을 결정할 수 있다. 일단 개방 판독 프레임이 규정되면, 이러한 개방 판독 프레임에 의해 암호화된 단백질의 아미노산 서열을 결정하는 것은 통상적인 일이다. 이러한 방법으로, 전체 SP 단백질 유전자의 뉴클레오티드 서열 뿐만 아니라 SP 단백질 및 동족체의 아미노산 서열을 동정할 수 있다.

모든 진핵 세포는 잠재적으로, SP 단백질 유전자의 분자상 클로닝에 대한 핵산 공급원으로서 제공될 수 있다. 상기 핵산은 척추동물, 포유동물, 사람, 돼지, 소, 고양이, 조류, 말, 개 뿐만 아니라 부가의 영장류 공급원, 곤충, 식물 등으로부터 분리시킬 수 있다. DNA는 목적하는 세포로부터 정제된 게놈성 DNA 또는 이의 단편을 클로닝하거나, 화학적으로 합성하거나 또는 cDNA 클로닝함으로써, 클로닝된 DNA(예: DNA '라이브러리')로부터 당해 분야에 공지된 과정에 의해 수득할 수 있다[참조: Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II]. 게놈성 DNA로부터 유래된 클론은 암호화 영역 이외에도, 조절성 및 인트론 DNA 영역을 함유할 수 있고; cDNA로부터 유래된 클론은 엑손 서열만을 함유한다. 공급원이 무엇이든지 간에, 유전자는 이러한 유전자를 증식시키는데 적합한 벡터 내로 분자상 클로닝시켜야 한다.

게놈성 DNA로부터 유전자를 분자상 클로닝하는데 있어서, DNA 단편이 생성되는데, 이들 중의 몇몇은 목적하는 유전자를 암호화한다. DNA는 각종 제한 효소를 사용하여 특정 부위에서 절단시킬 수 있다. 또 다른 한편, 망간의 존재하에 DNAse를 사용하여, DNA를 단편으로 만들 수 있거나, 또는 DNA를 예를 들어, 초음파처리함으로써 물리적으로 절단시킬 수 있다. 이어서, 아가로즈 및 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 칼럼 크로마토그래피를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 표준 기술에 의해, 선형 DNA 단편을 크기별로 분리시킬 수 있다.

일단 DNA 단편이 생성되면, 목적하는 유전자를 함유하는 특이적 DNA 단편을 수 많은 방식으로 동정할 수 있다. 예를 들면, SP 단백질(모든 종 기원) 유전자의 일부분(예를 들면, 상기 언급된 바와 같이 수득된 PCR 증폭 생성물 또는

공지된 뉴클레오티드의 일부분 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드) 또는 이의 특이적 RNA, 또는 이의 단편을 정제 또는 표지시키고, 생성된 DNA 단편을, 표지된 프로브와의 핵 산 하이브리드화에 의해 스크리닝할 수 있다[참조: Benton and Davis, Science 196:180 (1977); Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961 (1975)]. 이들 DNA 단편은 하이브리드화되는 프로브와 실질적으로 상동성일 것이다. 제한 효소 분해시키고, 입수 가능한 경우에 공지된 제한 지도 또는 DNA 서열 분석에 의해 예상되는 크기와 단편 크기를 비교하고, SP 단백질의 공지된 뉴클레오티드 서열과 비교함으로써, 적당한 단편을 동정하는 것이 또한 가능하다. 해당 유전자의 특성을 기준으로 하여 추가의 선별을 수행할 수 있다. 또 다른 한편, 유전자의 존재 여부는 이의 발현된 생성물의 물리적, 화학적 또는 면역학적 특성에 기초한 검정법에 의해 검출할 수 있다. 예를 들면, 유사하거나 동일한 전기영동적 이동도, 등전 집중 거동, 단백질분해 지도, 항원성, 세린 프로테아제 활성을 갖는 단백질을 생성시키는, 적당한 mRNA를 하이브리드-선별해 주는 DNA 클론, 또는 cDNA 클론을 선별할 수 있다. 항-SP 단백질 항체가 이용 가능한 경우에는, 표지된 항체를 추정상 SP 단백질-합성 클론에 결합함으로써, ELISA(효소 연결 면역흡착 검정)-유형 과정에서 해당 단백질을 동정할 수 있다.

CVSP14 폴리펩티드 게놈성 DNA를 분리시키는 또 다른 방법에는 공지된 서열로부터 유전자 서열을 화학적으로 합성하는 방법, 또는 cDNA를 SP 단백질을 암호화하는 mRNA로 만드는 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, SP 단백질 유전자를 cDNA 클로닝하기 위한 RNA는 상기 단백질을 발현하는 세포로부터 분리시킬 수 있다. 이어서, 이와 같이 동정되고 분리된 핵산을 적당한 클로닝 벡터 내로 삽입시킬 수 있다. 당해 분야에 공지된 다수의 벡터-숙주 시스템을 사용할 수 있다. 가능한 벡터에는 플라스미드 또는 변형된 바이러스가 포함되지만, 이에 제한되지 않고, 상기 벡터 시스템은 사용된 숙주 세포와 화합성이어야만 한다. 이러한 벡터에는 박테리오파아지, 예를 들면, 람다 유도체, 또는 플라스미드, 예를 들면, pBR322 또는 pUC 플라스미드 유도체 또는 Bluescript 벡터(Stratagene, La Jolla, CA)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 클로닝 벡터 내로의 삽입은, 예를 들어, 상보적 점착성 말단을 갖는 클로닝 벡터 내로 DNA 단편을 연결함으로써 수행될 수 있다. DNA을 단편으로 만드는데 사용된 상보적 제한 부위가 클로닝 벡터 내에 존재하지 않을 경우에는, DNA 분자의 말단을 효소적으로 변형시킬 수 있다. 또 다른 한편, 뉴클레오티드 서열(링커)을 DNA 말단 상에 연결시킴으로써 목적하는 어떠한 부위도 생성시킬 수 있고; 이와 같이 연결된 링커는 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열을 암호화하는 화학적으로 합성된 특이적 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또 다른 방법에서는, 상기 절단된 벡터 및 SP 단백질 유전자를 단독중합체성 테일링에 의해 변형시킬 수 있다. 재조합 분자는, 예를 들어, 형질전환, 형질감염, 감염, 전기천공 및 공명천공(sonorporation)을 통하여 숙주 세포 내로 도입할 수 있기 때문에, 해당 유전자 서열의 많은 복사물이 생성된다.

특정 양태에서는, 분리된 SP 단백질 유전자, cDNA 또는 합성된 DNA 서열이 혼입된 재조합 DNA 분자를 이용하여 숙주 세포를 형질전환시키면, 해당 유전자의 다중 복사물이 생성될 수 있다. 따라서, 이러한 유전자는, 형질전환체를 성장시키고, 이러한 형질전환체로부터 재조합 DNA 분자를 분리시키며, 경우에 따라, 상기 분리된 재조합 DNA로부터 삽입된 유전자를 회수함으로써 다량으로 수득할 수 있다.

E. SP 단백질 또는 이의 프로테아제 도메인을 암호화하는 핵산을 함유하는 벡터, 플라스미드 및 세포, 및 SP 단백질의 발현

벡터 및 세포

하나 이상의 SP 단백질을 재조합 발현하기 위해, 이러한 SP 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 전부 또는 일부를 함유하는 핵산을 적당한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질 암호화 서열의 전사 및 해독에 필요한 요소들을 함유하는 벡터 내로 삽입시킬 수 있다. 필수 전사 및 해독 시그날이 SP 유전자에 대한 천연 프로모터 및/또는 이들의 플랭킹 영역에 의해 공급될 수도 있다.

또한, SP를 암호화하는 핵산을 함유하는 벡터가 제공된다. 이러한 벡터를 함유하는 세포가 또한 제공된다. 상기 세포에는 진핵 및 원핵 세포가 포함되고, 벡터는 본원에서 사용하기에 적합한 어떠한 것일 수 있다.

상기 벡터를 함유하는 진핵 및 원핵 세포(내피 세포 포함)가 제공된다. 이러한 세포에는 세균 세포, 효모 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 동물 세포가 포함된다. 상기 언급된 세포를, 암호화된 SP 단백질 또는 SP 단백질의 프로테아제 도메인을 상기 세포에 의해 발현시키는 조건하에 성장시키고, 이와 같이 발현된 프로테아제 도메인 단백질을 회수함으로써, 상기 세포를 사용하여 SP 단백질 또는 이의 프로테아제 도메인을 생성시킨다. 본원의 목적상, 상기 프로테아제 도메인을 배지 내로 분비시킬 수 있다.

한 양태에서는, SP 단백질의 프로테아제 활성을 지니고 있고 이러한 SP 단백질의 프로테아제 도메인 전부 또는 일부, 또는 이의 다중 복사체를 함유하는 폴리 펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터가 제공된다. 또한, 완전한 길이의 SP 단백질까지 및 이를 전부 포함한, SP 단백질의 프로테아제 도메인 및 부가 부분을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터가 제공된다. 벡터는 세포 내에서 SP 단백질 또는 이의 프로테아제 도메인을 발현하도록 선택될 수 있거나 또는 SP 단백질이 분비된 단백질로서 발현되도록 선택될 수 있다. 또 다른 한편, 벡터는 암호화

된 단백질을 분비시키는데 필요한 시그날을 포함할 수 있다. 프로테아제 도메인이 발현된 경우, 분비 시그날, 예를 들면, 삭카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisia*) α교배 인자 시그날 서열 또는 이의 일부분, 또는 본래의 시그날 서열을 암호화하는 핵산에 연결시킨다.

각종 숙주-벡터 시스템을 사용하여 단백질 암호화 서열을 발현할 수 있다. 이들에는 바이러스(예: 백시니아 바이러스, 아데노바이러스 등)에 감염된 포유동물 세포 시스템; 바이러스(예: 바쿨로바이러스)에 감염된 곤충 세포 시스템; 효모 벡터를 함유하는 미생물, 예를 들면, 효모; 또는 박테리오파아지, DNA, 플라스미드 DNA, 또는 코스미드 DNA로 형질전환시킨 세균이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터의 발현 요소는 이들의 강도 및 특이성에 있어 다양하다. 사용된 숙주-벡터 시스템에 따라서, 적합한 수 많은 전사 및 해독 요소들 중의 어느 하나를 사용할 수 있다.

DNA 단편을 벡터 내로 삽입시켜 주는 것으로 당업자에게 공지된 모든 방법을 사용하여, 적당한 전사/해독 조절 시그날과 단백질 암호화 서열을 함유하는 키메릭 유전자를 함유하는 발현 벡터를 작제할 수 있다. 이들 방법에는 시험관내 재조합 DNA 및 합성 기술, 및 생체내 재조합(유전적 재조합) 방법이 포함될 수 있다. SP 단백질, 또는 이의 도메인, 유도체, 단편 또는 상동체를 암호화하는 핵산 서열의 발현은 제2 핵산 서열에 의해 조절하여, 재조합 DNA 분자(들)로 형질전환시킨 숙주 내에 해당 유전자 또는 이의 단편이 발현되도록 한다. 예를 들면, 단백질의 분해는 당해 분야에 공지된 모든 프로모터-인핸서에 의해 제어할 수 있다. 특정 양태에서는, 프로모터가 SP 단백질에 대한 유전자 본래의 것이 아니다. 사용될 수 있는 프로모터에는 SV40 초기 프로모터[참조: (Bernoist and Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)]; 라우스 육종 바이러스의 3' 장 말단 반복체에 함유된 프로모터[참조: Yamamoto et al. Cell 22:787-797 (1980)]; 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터[참조: Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445 (1981)]; 메탈로티오네인 유전자의 조절성 서열[참조: Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)]; 원핵성 발현 벡터, 예를 들면, β-락타마제 프로모터[참조: Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731 1978]; 또는 tac 프로모터[참조: DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25 (1983) ;'Useful Proteins from Recombinant Bacteria': in Scientific American 242:79-94 (1980)]; 노팔린 신테타제 프로모터를 함유하는 식물 발현 벡터[참조: Herrar-Estrella et al., Nature 303:209-213 (1984)] 또는 칼리플라워 모자이크 바이러스 35S RNA 프로모터[참조: Garder et al., Nucleic Acids Res. 9: 2871 (1981)], 및 광합성 효소 리불로즈 비스포스페이트 카복실라제의 프로모터[참조: Herrera-Estrella et al., Nature 310: 115-120 (1984))]; 효모 및 기타 진균으로부터의 프 로모터 요소, 예를 들면, Gal4 프로모터, 알코올 데하이드로게나제 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 프로모터, 알칼린 포스파타제 프로모터, 및 조직 특이성을 나타내고 형질전환된 동물에 사용되어 온 다음 동물 전사 조절 영역: 췌장성 포도상선 세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 조절 영역[참조: Swift et al., Cell 38: 639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)]; 췌장성 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 조절 영역[참조: Hanahan et al., Nature 315: 115-122 (1985)], 림프양 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 조절 영역[참조: Grosschedl et al., Cell 38: 647-658 (1984); Adams et al., Nature 318: 533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)], 고환, 유방, 림프양 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유선 종양 바이러스 조절 영역[참조: Leder et al., Cell 45: 485-495 (1986)], 간에서 활성인 알부민 유전자 조절 영역[참조: Pinckert et al., Genes and Devel. 1: 268-276 (1987)]), 간에서 활성인 알파-페토프로테인 유전자 조절 영역[참조: Krumlauf et al., Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235: 53-58 (1987)], 간에서 활성인 알파-1 안티트립신 유전자 조절 영역[참조: Kelsey et al., Genes and Devel. 1: 161-171 (1987)], 골수양 세포에서 활성인 베타 글로빈 유전자 조절 영역[참조: Mogram et al., Nature 315: 338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46: 89-94 (1986)], 뇌의 희돌기 교세포에서 활성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역[참조: Readhead et al., Cell 48: 703-712 (1987)], 골격근에서 활성인 미오신 경 쇄-2 유전자 조절 영역[참조: Sani, Nature 314: 283-286 (1985)], 및 시상하부의 성선자극호르몬분비세포에서 활성인 성선자극 방출 호르몬 유전자 조절 영역[참조: Mason et al., Science 234: 1372-1378 (1986)]이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

특정 양태에서는, SP 단백질, 또는 이의 도메인, 단편, 유도체 또는 상동체를 암호화하는 핵산에 작동적으로 연결된 프로모터, 하나 이상의 복제 기점, 및 임의의 하나 이상의 선별성 마커(예: 항생제 내성 유전자)를 함유하는 벡터가 사용된다. SP 단백질의 암호화 서열 또는 이의 일부분을 함유하는 발현 벡터는, 암호화 부분을 3가지 pGEX 벡터 각각의 EcoRI 제한 부위 내로 아클로닝함으로써 제조한다[글루타티온 S-트랜스퍼라제 발현 벡터(Smith and Johnson, Gene 7:31-40 (1988))]. 이로써, 생성물을 정확한 판독 프레임에 발현시킬 수 있다. SP 단백질의 프로테아제 도메인을 발현하기 위한 벡터 및 시스템에는 널리 공지된 피치아(Pichia) 벡터(공급원: Invitrogen, San Diego, CA), 특히 암호화된 단백질을 분비하도록 고안된 것이 포함된다. 한 가지 예시 벡터가 본 실시예에 기재되어 있다.

이. 콜라이(E. coli) 세포를 형질전환시키기 위한 플라스미드에는, 예를 들며, pET 발현 벡터[참조: 미국 특허 제4,952,496호; 공급원: NOVAGEN, Madison, WI; 이러한 시스템에 관해 설명하고 있는 Novagen에 의해 공개된 문헌 참조]. 이러한 플라스미드에는 T7lac 프로모터, T7 종결인자, 유도성 이. 콜라이 lac 작동인자 및 lac 억제인자 유전자를 함유하는 pET 11a; T7 프로모터, T7 종결인자, 및 이. 콜라이 ompT 분비 시그날을 함유하는 pET 12a-c; 및 절단시킨 후 칼럼 상에서 정제시켜 주는, His 칼럼과 트롬빈 절단 부위를 이용하여 정제에 사용하기 위한 His-Tag™ 리더 서열, T7-lac 프로모터 영역 및 T7 종결인자를 함유하는 pET 15b 및 pET 19b(NOVAGEN, Madison, WI)가 포함된다.

벡터를 숙주 세포, 예를 들면, 피치아 세포 및 세균 세포, 예를 들면, 이. 콜라이 세포 내로 도입하면, 이안에서 단백질이 발현된다. 공지되어 있고 용이하게 입수 가능한 피치아 균주로는 예를 들면, GS115가 있다. 세균성 숙주는 유도성 프로모터, 예를 들면, lacUV 프로모터에 작동적으로 연결된 T7 RNA 폴리머라제를 암호화하는 DNA의 염색체성 복사체를 함유할 수 있다(미국 특허 제4,952,496호 참조). 이러한 숙주에는 용원성 이. 콜라이 균주 BL21(DE3)이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

단백질의 발현 및 생성

SP 도메인, 유사체 및 동족체는 당해 분야에 공지된 각종 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 일단 SP 단백질, 또는 이의 도메인, 단편 또는 유도체를 발현하는 재조합 세포를 동정하게 되면, 개개의 유전자 생성물을 분리 및 분석할 수 있다. 이는, 해당 단백질의 물리적 및/또는 기능적 특성에 기초한 검정법에 의해 달성되는데, 이러한 검정법에는 생성물을 방사성 표지시킨 다음, 겔 전기영동에 의해 분석하는 방법, 면역검정법, 마커-표지된 생성물에 대한 가교 결합법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

CVSP14 폴리펩티드는 (해당 복합체 또는 단백질을 발현하는 재조합 숙주 세포 또는 천연 공급원으로부터) 당해 분야에 공지된 표준 방법에 의해 분리 및 정제 할 수 있는데, 이러한 방법에는 칼럼 크로마토그래피(예: 이온 교환, 친화, 겔 배제, 역상 고압, 신속 단백질 액체 등), 차동 원심분리, 차동 용해도, 또는 단백질 정제에 사용되는 기타 표준 기술이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 기능적 특성은 당해 분야에 공지된 적합한 모든 검정을 이용하여 평가할 수 있다.

또 다른 한편, 일단 SP 단백질 또는 이의 도메인 또는 유도체가 동정되면, 이를 암호화하는 유전자의 뉴클레오티드 서열로부터, 상기 단백질의 아미노산 서열을 추론할 수 있다. 그 결과, 상기 단백질 또는 이의 도메인 또는 유도체를 당해 분야에 공지된 표준 화학적 방법에 의해 합성할 수 있다[참조: Hunkapiller et al., Nature 310:105-111 (1984)].

SP 단백질 서열의 조작은 단백질 수준에서 이루어질 수 있다. 또한, 해독 동안 또는 해독 후, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호/차단 그룹에 의한 유도체화, 단백질분해적 절단, 항체 분자 또는 기타 세포성 리간드에 대한 연결 등에 의해 차별적으로 변형시킨, SP 단백질, 이의 도메인, 유도체, 동족체 또는 단편이 본원에 고려된다. 수 많은 화학적 변형법이 공지된 기술, 예를 들면, 시아노 브로마이드, 트립신, 키모트립신, 파파인, V8 프로테아제, $NaBH_4$ 에 의한 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포밀화, 산화, 환원, 투니카마이신의 존재하에서의 대사적 합성 등에 의해 수행될 수 있다.

또한, SP 단백질의 도메인, 동족체 및 유도체는 화학적으로 합성할 수 있다. 예를 들어, 목적하는 도메인을 포함하거나 목적하는 시험관내 활성을 매개하는, SP 단백질의 특정 부분에 상응하는 펩티드는 펩티드 합성기를 사용함으로써 합성할 수 있다. 더우기, 경우에 따라, 비-전통적 아미노산 또는 화학적 아미노산 동족체를 치환체 또는 부가물로서 SP 단백질 서열 내로 도입할 수 있다. 비-전통적 아미노산에는 통상 아미노산의 D-이성체, a-아미노 부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노부티르산, ε-Abu, e-Ahx, 6-아미노 헥사노산, Aib, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르루이신, 노르발린, 하이드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 시스테산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, β-알라닌, 플루오로-아미노산, 디자이너(designer) 아미노산, 예를 들면, β-메틸 아미노산, Ca-메틸 아미노산, Na-메틸 아미노산, 및 일반적으로 아미노산 동족체가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 더우기, 상기 아미노산은 D(우선회) 또는 L(좌선회)일 수 있다.

천연 생성물이 돌연변이를 나타내는 것으로 추정되거나 또는 새로운 종으로부터 분리되는 경우에는, 천연 공급원으로부터 분리될 뿐만 아니라 시험관내에서 발현되거나 또는 생체내 또는 시험관내에서 합성된 발현 벡터로부터의 SP 단백질의 아미노산 서열은 DNA 서열 분석으로부터 결정될 수 있거나, 아니면 분리된 단백질을 직접 서열분석함으로써 결정할 수 있다. 이러한 분석은 수동으로 서열분석하거나 자동화 아미노산 서열분석기를 사용함으로써 수행할 수 있다.

특히, CVSP14의 프로테아제 도메인을 발현하기 위해서는, 시그날 서열을 사용하지 않고 세포에서 단백질을 발현시켜, 프로테아제 도메인을 함유하는 봉입체가 축적 또는 형성되도록 하는 것이 유리한 것으로 밝혀졌다. 이러한 봉입체는 프로 테아제 도메인을 분리, 변성, 가용화 및 재폴딩시킨 다음, R1 부위에서의 절단에 의해 활성화된다(본 실시예 참조).

변형

SP 단백질 및 도메인의 각종 변형이 본원에 고려된다. SP-암호화 핵산 분자는 당해 분야에 공지된 수 많은 전략에 의해 변형시킬 수 있다[참조: Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York]. 이 서열을 적당한 부위에서 제한 엔도뉴클레아제(들)를 사용하여 절단시킨 다음, 추가로 효소적 변형시키며, 경우에 따라, 분리시킨 다음, 시험관내에서 연결시킨다. SP의 도메

인, 유도체 또는 동족체를 암호화하는 유전자를 생성하는데 있어서는, 변형된 유전자가, 목적하는 활성이 암호화되는 유전자 영역에서 해독 중지 시그날에 의해 방해되지 않은 본래의 해독 판독 프레임을 보유하도록 주의을 기울여야 한다.

부가적으로, SP-암호화 핵산 분자를 시험관내 또는 생체내에서 돌연변이시켜, 해독, 개시 및/또는 종결 서열을 생성 및/또는 파괴시키거나, 또는 암호화 영역에 변이물을 생성시키고/시키거나 새로운 제한 엔도뉴클레아제 부위를 형성시키거나 기존의 것을 파괴시켜, 추가의 시험관내 변형을 촉진시킬 수 있다. 또한, 본원에 기재된 바와 같이, 1차 서열을 변화시킨, 예를 들면, Cys 잔기를 대체시키고 글리코실화 부위를 제거시킨 뮤테인이 고려된다. 이러한 돌연변이는 당해 분야에 공지된 모든 돌연변이유발 기술에 의해 수행될 수 있으며, 이에는 화학적 돌연변이유발 및 시험관내 부위-지시된 돌연변이유발[참조: Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253: 6551-6558 (1978)], TAB 링커(Pharmacia) 의 사용이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 한 가지 양태에서는, 예를 들어, SP 단백질 또는 이의 도메인이 형광성 표지를 포함하도록 변형시킨다. 기타 특정 양태에서는, SP 단백질이 이종-기능성 시약을 갖도록 변형시켜, 이종-기능성 시약이 해당 복합체의 구성원을 가교결합시키는데 사용될 수 있도록 한다.

SP 단백질은 (해당 복합체 또는 단백질을 발현하는 재조합 숙주 세포 또는 천연 공급원으로부터) 당해 분야에 공지된 표준 방법에 의해 분리 및 정제할 수 있는데, 이러한 방법에는 칼럼 크로마토그래피(예: 이온 교환, 친화, 겔 배제, 역상 고압, 신속 단백질 액체 등), 차동 원심분리, 차동 용해도, 또는 단백질 정제에 사용되는 기타 표준 기술이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 기능적 특성은 당해 분야에 공지된 적합한 모든 검정을 이용하여 평가할 수 있다.

F. 스크리닝 방법

본원에 제시된 바와 같은 일본쇄 프로테아제 도메인은, 이의 활성을 조절하는 화합물을 동정하기 위한 각종 방법에 사용될 수 있다. 종양 세포에서 보다 높은 활성 또는 발현을 나타내는 SP의 경우에는, 단백질분해 활성을 억제시키는 화합물이 특히 관심있다. 종양 세포에서 보다 낮은 수준의 활성을 나타내는 SP의 경우에는, 상기 활성을 증강시키는 화합물 또는 제제가 잠재적으로 관심이 있다. 모든 경우에 있어, 상기와 같이 동정된 화합물에는 후보 암 치료물인 제제가 포함된다.

몇 가지 유형의 검정법이 본원에 예시 및 기재되어 있다. 프로테아제 도메 인을 기타 검정에 사용할 수 있다는 것은 인지해야 한다. 그러나, 일본쇄 프로테아제 도메인이 촉매적 활성을 나타내는 것으로 본원에 제시되어 있다. 그 자체로서, 이는 시험관내 스크리닝 검정에 이상적이다. 이들을 결합 검정에 사용할 수도 있다.

CVSP14 완전한 길이의 지모겐, 활성화된 효소, 일본쇄 및 이본쇄 프로테아제 도메인이, 본원에 제공된 것을 포함한, 당업자에게 공지된 모든 스크리닝 검정에 사용하도록 고려된다. 따라서, 다음 기재 내용이 단백질분해적 검정에 지시된 경우에, 이는 모든 SP(CVSP14 포함)의 일본쇄 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분의 사용에 적용될 수 있다. 특히 CVSP14, 및 이의 모든 변이체(예: 스플라이스 변이체)와 함께 사용하기 위한 기타 검정, 예를 들면, 결합 검정이 본원에 제공된다.

1. SP 단백질의 프로테아제 활성을 조절하는 제제를 동정하기 위한 촉매적 검정

SP, 특히 이의 일본쇄 프로테아제 도메인 또는 촉매적 활성 부분의 촉매적 활성 조절제를 동정하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은 a) CVSP14, 완전한 길이의 지모겐 또는 활성화 형태, 및 특히, 이의 일본쇄 도메인을 시험 물질의 존재하에 CVSP14의 기질과 접촉시키고, 이러한 기질의 단백질분해 작용을 검정함으로써, CVSP14의 활성을 평가하고, 이를 대조군의 활성과 비교함으로써 실시할 수 있다. 예를 들어, 대조군은 완전한 길이의 지모겐 또는 활성화 형태, 및 특히 이의 일본쇄 도메인을 포함한 CVSP14, 특히 이의 일본쇄 도메인을 CVSP14의 기질과 접촉시키고, 이러한 기질의 단백질분해 작용을 검출함으로써, CVSP14의 활성을 평가함으로써 평가된 CVSP14의 활성일 수 있다. 시험 화합물의 존재 및 부재하에서의 결과를 비교한다. 활성 간의 차이는 시험 물질이 CVSP14의 활성을 조절한다는 것을 지시해준다. 활성화의 활성화제가 또한 고려되는데, 이러한 검정은 다음에 논의된다.

한 양태에서는, 다수의 시험 물질을 상기 스크리닝 방법에서 동시에 스크리닝한다. 또 다른 양태에서는, CVSP14를, 표적 세포에 잠재적으로 특이적인 제제를 동정하기 위한 수단으로서 상기 표적 세포로부터 분리시킨다.

또 다른 양태에서는, 시험 물질이 치료학적 화합물이므로, 시험 물질의 존재 및 부재하에서 측정된 CVSP14 활성 간의 차이는 표적 세포가 치료학적 화합물에 반응한다는 것을 지시해준다.

한 가지 방법은 (a) CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인을, 리간드와 해당 화합물 간의 상호작용이 수행되도록 하는 조건하에 하나 또는 다수의 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및 b) 리간드와 특이적으로 결합하는 다수 중의 하나 이상의 화합물을 동정하는 단계를 포함한다.

본원에 제공된 또 다른 방법은 a) CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인을 CVSP14 폴리펩티드의 기질과 접촉시키고, 이러한 기질의 단백질분해 작용을 검출함으로써, CVSP14 폴리펩티드의 활성을 평가하는 단계; b) CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인을, 시험 물질의 존재하에 CVSP14 폴리펩티드의 기질과 접촉시키고, 이러한 기질의 단백질분해 작용을 검출함으로써, CVSP14 폴리펩 티드의 활성을 평가하는 단계; 및 c) 단계 a) 및 b)에서 평가된 CVSP14 폴리펩티드의 활성을 비교하는 단계를 포함하는데, 단계 a)에서 측정된 활성이 단계 b)에서 측정된 활성과 상이하다는 것은 해당 시험 물질이 CVSP14 폴리펩티드의 활성을 조절한다는 것을 지시해준다.

또 다른 양태에서는, 다수의 시험 물질을 동시에 스크리닝한다. 특정 시험 물질이 CVSP14 폴리펩티드의 조절제인지를 평가하기 위해 시험 물질의 존재 및 부재하에서의 CVSP14 폴리펩티드의 활성을 비교하는데 있어서, 이들 활성을 동시에(나란히) 검정할 필요는 없는데, 이러한 동시 측정이 전형적이긴 하다. CVSP14 폴리펩티드의 활성을 1회 측정하고, 이와 같이 측정된 활성을 CVSP14 폴리펩티드의 역사적 활성 값과 비교할 수 있다.

예를 들어, CVSP14 폴리펩티드의 활성을 시험 물질의 존재하에 측정하고, 이를 시험 물질의 부재하에서 미리 측정된 CVSP14 폴리펩티드의 역사적 활성 값과 비교할 수 있다. 이는, 예를 들어, 해당 검정을 수행하기 위한 키트가 제공된 삽입체 또는 팜플렛 상에 CVSP14 폴리펩티드의 활성을 제공함으로써 수행될 수 있다.

특정한 SP에 대한 기질을 선별하는 방법이 본 실시예에 기재어 있고, 특정한 단백질분해적 검정이 예시되어 있다.

조합물, 및 해당 검정을 수행하기 위한 지시사항이 임의로 포함된, 상기 조합물을 함유하는 키트가 제공된다. 이러한 조합물은 CVSP14 폴리펩티드 및 검정하고자 하는 CVSP14 폴리펩티드의 기질; 및 임의로, 이러한 기질의 단백질분해 작용을 검출하기 위한 시약을 포함한다. 특정한 CVSP14 폴리펩티드에 의해 단백질분해 작용시킨 기질(이는 발색성 또는 형광원성 분자일 수 있고, 이에는 단백질이 포함된다)은 시험 물질을 절단시키는 CVSP14 폴리펩티드의 능력을 시험함으로써 실험적으로 동정할 수 있다. 가장 효율적으로 절단되는(즉, 가장 낮은 농도 및/또는 가장 신속한 속도 또는 바람직한 조건하에 절단되는) 기질을 동정한다.

부가적으로, 상기 언급된 조합물을 함유하는 키트가 본원에 제공된다. 이러한 키트는 CVSP14 폴리펩티드 활성 조절제를 동정하기 위한 지시사항을 임의로 포함한다. 모든 CVSP14 폴리펩티드가 이의 활성 조절제를 동정하기 위한 표적으로서 고려된다.

2. 결합 검정

또한, CVSP14와 결합하는 제제, 특히 화합물을 동정 및 분리시키는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 검정은 지모겐 형태, 일본쇄의 분리된 프로테아제 도메인(또는 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인을 함유하는, CVSP14 폴리펩티드 이외의 단백질), 및 활성화 형태(이에는 완전한 길이의 지모겐으로부터 유도되거나 또는 신장된 프로테아제 도메인으로부터 유래된 활성화 형태가 포함된다)와 결합하는 제제를 동정하도록 고안된다. 이와 같이 동정된 화합물은 종양과, 이상한 혈관형성 과정과 연관된 기타 장애 및 질병을 치료하기 위한 화합물을 동정하기 위한 후보물 또는 선도물이다. 상기 방법에 사용된 CVSP14 폴리펩티드에는 본원에서 정의된 바와 같은 모든 CVSP14 폴리펩티드가 포함되고, 이에는 CVSP14 일본쇄 프로테아제 도메인 또는 이의 단백질분해적 활성 부분이 포함된다.

각종 방법이 본원에 제공된다. 이들 방법은 CVSP14 폴리펩티드(들) 또는 이 의 프로테아제 도메인(들)을 직접적으로 또는 링커를 통하여 간접적으로 고체 지지체에 연결시키는 용액 또는 고체 상 반응으로 수행할 수 있다. 스크리닝 검정이 본 실시예에 기재되어 있고, 이들 검정은 후보 화합물을 동정하는데 사용되어 왔다. 본원의 목적상, 상기 언급된 모든 결합 검정이 CVSP14에 대해 제공된다.

CVSP14 일본쇄 프로테아제 도메인, 지모겐 또는 완전한 길이의 활성화 CVSP14 또는 이의 이본쇄 프로테아제 도메인과 특이적으로 결합하는 제제, 예를 들면, 화합물을 동정하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은 a) CVSP14를, 이러한 CVSP14와 제제 간의 결합이 수행되도록 하는 조건하에 하나 또는 다수의 시험 제제와 접촉시키는 단계; 및 b) CVSP14와 특이적으로 결합하는, 다수의 제제 중의 하나 이상의 제제를 동정하는 단계에 의해 실시될 수 있다.

예를 들어, 이러한 방법을 실시하는데 있어서, CVSP14 폴리펩티드를, 잠재적 결합 파트너와 상기 폴리펩티드의 연합을 허용해 주는 조건하에 특정 세포의 추출물 또는 분획, 또는 잠재적 결합 파트너와 혼합시킨다. 혼합 후, CVSP14와 연합된 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 기타 분자를 상기 혼합물로부터 분리시킨다. 이어서, CVSP14와 결합된 결합 파트너를 제거하고, 이를 추가로 분석할 수 있다. 결합 파트너를 동정 및 분리하기 위해, 전체 단백질, 예를 들면, 서열 6에 제시된 전체 단백질을 사용할 수 있다. 또 다른 한편, 이러한 단백질의 단편을 사용할 수도 있다.

각종 방법을 사용하여, 세포 추출물 또는 체액, 예를 들면, 혈액, 혈청, 뇨, 땀, 활액, CSF 및 기타 체액을 획득할 수 있다. 예를 들어, 물리적 또는 화학적 파괴 방법을 사용하여, 세포를 파괴시킬 수 있다. 물리적 파괴 방법의 예에는 초음파 처리 및 기계적 전단 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 화학적 용해 방법의 예에는 세제 용해 및 효소 용

해법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 숙련인은 본 방법에 사용하기 위한 추출물을 획득하도록 세포성 추출물을 제조하는 방법을 이에 용이하게 변용시킬 수 있다.

일단 세포 추출물이 제조되면, 이러한 추출물을, 해당 단백질과 결합 파트너 간의 연합이 일어날 수 있는 조건하에 CVSP14와 혼합한다. 사람 세포의 세포질에서 발견되는 것과 유사한 조건을 포함한 각종 조건을 사용할 수 있다. 사용된 세포성 추출물의 특징, 예를 들어, 삼투압, pH, 온도 및 농도는 해당 단백질과 결합 파트너 간의 연합을 최적화하도록 다양하게 변화시킬 수 있다. 유사하게, 관심있는 분자를 체액으로부터 분리하는 방법이 공지되어 있다.

적당한 조건하에 혼합한 후, 결합된 복합체를 상기 혼합물로부터 분리시킨다. 각종 기술을 사용하여, 상기 혼합물을 분리시킬 수 있다. 예를 들어, CVSP14에 특이적인 항체를 사용하여, 결합 파트너 복합체를 면역침전시킬 수 있다. 또 다른 한편, 표준 화학적 분리 기술, 예를 들면, 크로마토그래피 및 밀도/침강 원심분리를 사용할 수 있다.

추출물 중의 연합되지 않은 세포성 구성분을 제거한 후, 통상적인 방법을 사용하여 결합 파트너를 복합체로부터 해리시킬 수 있다. 예를 들어, 혼합물의 염 농도 또는 pH를 변화시킴으로써 해리를 수행할 수 있다.

연합된 결합 파트너 쌍을 혼합 추출물로부터 분리시키는 것을 보조하기 위 해, CVSP14를 고체 지지체 상에 고정화시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 단백질을 니트로셀룰로즈 매트릭스 또는 아크릴계 비드에 부착시킬 수 있다. 상기 단백질 또는 이의 단편을 고체 지지체에 부착시키는 것은, 펩티드/결합 파트너 쌍을 추출물 내에서 발견된 기타 구성분으로부터 분리시키는 것을 도와준다. 이와 같이 동정된 결합 파트너는 단일 단백질이거나, 또는 2개 이상의 단백질로 구성된 복합체일 수 있다.

또 다른 한편, 일본쇄 프로테아제를 암호화하는 핵산 분자를 효모 2-하이브리드 시스템에 사용할 수 있다. 이러한 효모 2-하이브리드 시스템은 기타 단백질 파트너 쌍을 동정하는데 사용되어 왔고, 이는 본원에 기재된 핵산 분자를 이용하도록 용이하게 변용시킬 수 있다.

특히 CVSP14에 대한 또 다른 시험관내 결합 검정은 이들 단백질 중의 하나의 촉매적 도메인을 적어도 함유하는 폴리펩티드와, 하나 이상의 후보 결합 표적 또는 기질과의 혼합물을 이용한다. 이 혼합물을 적당한 조건하에 항온처리한 후, CVSP14 또는 상기 촉매적 도메인을 함유하는 이의 폴리펩티드 단편이 후보 기질과 결합 또는 상호작용하는 능력을 평가한다. 세포-비함유 결합 검정의 경우에는, 이들 성분들 중의 하나가 검출 가능한 표지를 포함하거나 이와 커플링된다. 상기 표지는 직접적인 검출, 예를 들면, 방사능, 발광성, 광밀도 또는 전자 밀도 등, 또는 간접적인 검출, 예를 들면, 에피토프 태그, 효소 등에 제공될 수 있다. 각종 방법을 이용하여, 해당 표지 및 기타 검정 성분의 종류에 따라서 표지를 검출할 수 있다. 예를 들어, 고체 기질에 결합된 표지를 검출할 수 있거나 또는 표지를 함유하 는 결합된 복합체의 특정 부분을 고체 기질로부터 분리시킨 다음, 표지를 검출할 수 있다.

3. 신호전달의 검출

분비된 CVSP, 예를 들면, CVSP14는 시그날 변환에 있어, 세포 표면 수용체와 결합하거나 이와 상호작용함으로써 직접적으로 관여하거나, 또는 시그날 변환을 개시할 수 있는 단백질, 예를 들면, 프로-성장 인자를 활성화시킴으로써 간접적으로 관여할 수 있다. 시그날 변환을 평가하기 위한 검정법은 당업자에게 널리 공지되어 있고, 이는 CVSP14 폴리펩티드와 함께 사용도록 변용시킬 수 있다.

CVSP14, 특히 완전한 길이, 또는 CVSP의 세포외 도메인 또는 이의 기능성 부분을 특정 세포의 표면 상에 정착시키기에 충분한 부분에 의해 직접적 또는 간접적으로, 예를 들면, 프로-성장 인자의 활성화를 통하여 간접적으로 매개된 시그날 변환에 영향을 미치거나 이를 변화시키는 제제를 동정하기 위한 검정법이 제공된다. 이러한 검정법에는, 예를 들면, 리포터 유전자로부터의 발현에 대한 영향을 검출함으로써, 변환된 시그날의 조절작용을 평가하는 전사-이용 검정법이 포함된다(미국 특허 제5,436,128호 참조).

4. CVSP14를 암호화하는 핵산의 발현을 조절하는 제제를 동정하는 방법

또 다른 양태는 CVSP14를 암호화하는 핵산의 발현을 조절하는 제제를 동정하는 방법을 제공한다. 이러한 검정은 CVSP14를 암호화하는 핵산의 발현 수준 변화를 모니터하는데 이용 가능한 모든 수단을 사용한다.

한 가지 검정 포맷에서는, CVSP14 또는 이의 도메인, 특히 프로테아제 도메 인의 개방 판독 프레임과 검정 가능한 모든 융합 파트너 간의 리포터 유전자 융합체를 함유하는 세포주를 제조할 수 있다. 검정 가능한 수 많은 융합 파트너가 공지되어 있고 용이하게 입수 가능하며, 개똥벌레(firefly) 루시퍼라제 유전자 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제를 암호화하는 유전자가 포함된다[참조: Alam et al., Anal. Biochem. 188: 245-54 (1990)]. 이어서, 상기 리포터 유전자 융합물을 함유하는 세포주를 적당한 조건 및 시간 하에 시험하고자 하는 제제에 노출시킨다. 상기 제제에 노출된 샘플과 대조군 샘플 간에 리포터 유전자의 상이한 발현으로 인해, CVSP14를 암호화하는 핵산의 발현을 조절하

는 제제를 동정할 수 있다.

부가의 검정 형태를 사용하여, CVSP14를 암호화하는 핵산의 발현을 조절하는 제제의 능력을 모니터할 수 있다. 예를 들어, mRNA 발현은 핵산과 하이브리드화함으로써 직접적으로 모니터할 수 있다. 세포주를 적당한 조건 및 시간 동안 시험하고자 하는 제제에 노출시키고, 총 RNA 또는 mRNA를 표준 과정에 의해 분리시킨다[참조: Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press]. 제제에 노출된 세포와 대조군 세포 간의 RNA 발현 수준 차이를 검출하기 위한 프로브를 상기 핵산으로부터 제조할 수 있다. 높은 엄격성 조건하에 표적 핵산에만 하이브리드화되는 프로브를 고안하는 것이 전형적이긴 하지만, 필수 사항은 아니다. 높은 엄격성 조건하에서는 고도로 상보적인 핵산 하이브리드만이 형성된다. 따라서, 검정 조건의 엄격성이, 하이브리드를 형성하기 위해 2개의 핵산 쇄 간에 존재해야 하는 상보성의 양을 결정해준다. 엄격성은 프로브:표적 하이브리드와 잠재적 프로브:비-표적 하이브리드 간의 안정성 차이를 최대화하도록 선택되어야 한다.

프로브는 당해 분야에 공지된 방법을 통하여 핵산으로부터 고안될 수 있다. 예를 들어, 프로브의 G + C 함량과 프로브 길이는 프로브가 이의 표적 서열과 결합하는 것에 영향을 미칠 수 있다. 프로브 특이성을 최적화하는 방법이 통상적으로 이용 가능하다[참조: Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press); and Ausubel et al. (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY].

하이브리드화 조건은 공지된 방법을 사용하여, 각 프로브에 대해 요구되는 바와 같이 변형시킨다[참조: Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press); and Ausubel et al. (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY]. 총 세포성 RNA 또는 폴리A RNA에 대해 농축된 RNA의 하이브리드화는 이용 가능한 어떠한 형태로도 수행될 수 있다. 예를 들어, 총 세포성 RNA 또는 폴리A RNA에 대해 농축된 RNA를 고체 지지체에 고정시키고, 이러한 고체 지지체를, 프로브가 특이적으로 하이브리드화되는 조건하에 핵산 분자 중의 하나 이상 또는 이들 중의 하나의 일부를 포함하는 하나 이상의 프로브에 노출시킨다. 또 다른 한편, 상기 서열들 중의 하나 이상 또는 이들 중의 하나의 일부를 포함하는 핵산 단편을 고체 지지체, 예를 들면, 다공성 유리 웨이퍼에 고정시킬 수 있다. 이어서, 상기 유리 웨이퍼를, 고정된 서열이 특이적으로 하이브리드화되는 조건하에 특정 샘플로부터의 총 세포성 RNA 또는 폴리 A RNA에 노출시킬 수 있다. 이러한 유리 웨이퍼 및 하이브리드화 방법은 예를 들어, WO 95/11755(Beattie)에 기재된 바와 같이 광범위하게 이용될 수 있다. 특정 제제에 노출된 세포 집단으로부터 RNA 샘플 및 처리되지 않은 세포 집단으로부터의 RNA 샘플과 특이적으로 하이브리드화되는 소정의 프로브의 능력을 검사함으로써, CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 발현을 상향 조절 또는 하향 조절하는 제제를 동정한다.

한 가지 형태에서는, 노출되지 않은 대조군 세포 집단과 비교해서, 시험하고자 하는 제제에 노출시킨 세포 집단 간의 단백질의 상대량을 검정할 수 있다(예를 들면, 전립선암 세포주, 폐암 세포주, 결장암 세포주 또는 유방암 세포주). 이러한 형태에서는, 프로브, 예를 들면, 특이적 항체를 사용하여, 상이한 세포 집단 또는 체액 중의 해당 단백질의 활성 수준 또는 상이한 발현을 모니터한다. 세포주 또는 집단 또는 체액을 적당한 조건 및 시간 하에 시험하고자 하는 제제에 노출시킨다. 세포성 용해물 또는 체액을 상기 발현된 세포주 또는 집단, 및 대조군의 노출되지 않은 세포주 또는 집단 또는 노출되지 않은 체액으로부터 제조할 수 있다. 이어서, 이러한 세포성 용해물 또는 체액을, 프로브를 이용하여 분석한다.

예를 들면, CVSP14의 N- 및 C-말단 단편을 세균에서 발현시키고, 이를 사용하여, 이들 단편과 결합하는 단백질을 조사할 수 있다. 융합 단백질, 예를 들면, CVSP14의 N- 또는 C-말단 영역에 대한 His-태그 또는 GST 융합체를 기질로서 사용하기 위해 제조할 수 있다. 이들 융합 단백질을, 예를 들어, 글루타티온-세파로즈 비드에 커플링시킨 다음, 세포 용해물 또는 체액으로 프로빙시킬 수 있다. 용해에 앞서, 상기 세포 또는 체액을, CVSP14 또는 그 위에 존재하는 도메인과 상호작용하 는 단백질을 조절할 수 있는 후보 제제로 처리할 수 있다. 융합 단백질과 결합하는 용해물 단백질은, 당해 분야에 공지된 바와 같이 SDS-PAGE에 의해 분할시킬 수 있고, 단백질 서열분석 또는 질량 분광법에 의해 분리 및 동정할 수 있다.

항체 프로브는, 이들이 충분한 길이, 예를 들면, CVSP14 폴리펩티드의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 이상의 연속되는 아미노산인 경우이거나 또는 면역원성 증강에 요구되는 경우에, 적합한 운반체에 접합된 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 사용하여 적당한 면역화 프로토콜로 적합한 포유동물 숙주를 면역시킴으로써 제조한다. 운반체, 예를 들면, 소의 혈청 알부민(BSA), 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH) 또는 기타 운반체 단백질과의 면역원성 접합체를 제조하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 몇몇 상황에서는, 예를 들어, 카보디이미드 시약을 사용하는 직접적인 접합이 효과적일 수 있고; 다른 경우에는, 공급자(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)에 의해 제공된 바와 같은 연결 시약이 합텐에 대한 접근성을 제공하는데 바람직할 수 있다. 합텐 펩티드는 Cys 잔기를 갖는 아미노 또는 카복시 말단 중의 어느 한 말단에서 신장시킬 수 있거나 또는 시스테인 잔기를 산재시켜, 예를 들어, 운반체에 대한 연결을 촉진시킬 수 있다. 면역원의 투여는 당해 분야에 일반적으로 인지되는 바와 같이, 적합한 기간 동안 적합한 아쥬반트(adjuvant)를 사용함으로써 일반적으로 수행된다. 면역화 스케쥴 동안, 항체 역가치를 고려하여 항체 형성의 타당성을 결정한다.

예를 들어, CVSP14의 카복시 말단 아미노산에 상응하는 합성 펩티드를 사용하여, 항-펩티드 항체를 생성시킬 수 있다. 합성 펩티드는 길이가 1 내지 3개 아 미노산 정도로 작을 수 있고, 일반적으로 길이가 4개 이상의 아미노산 잔기이다. 이 펩티드는 표준 방법을 사용하여 KLH에 커플링시키고, 동물(예: 토끼 또는 유제류) 내로 면역시킬 수 있다. 이어서, 예를 들어, 공유 결합된 펩티드를 함유하는 악티겔 비드를 사용하여, 폴리클로날 항체를 정제시킬 수 있다.

이러한 방식으로 생성된 폴리클로날 항혈청이 몇몇 적용 분야에 만족할만한 수준이긴 하지만, 약제학적 조성물의 경우에는, 일반적으로 모노클로날 제제가 사용된다. 문헌[참조: Kohler et al., Nature 256:495-7 (1995)]의 표준 방법, 또는 일반적으로 공지된 바와 같이, 림프구 또는 비장 세포의 불멸화에 영향을 미치는 변형법을 사용하여, 목적하는 모노클로날 항체를 분비시키는 불멸화된 세포주를 제조할 수 있다. 목적하는 항체를 분비하는 이러한 불멸화된 세포주는 항원이 펩티드 합텐, 폴리펩티드 또는 단백질인 면역검정에 의해 스크리닝한다. 목적하는 항체를 분비하는 적당한 불멸화된 세포 배양물을 동정하는 경우에는, 상기 세포를 복수액을 통하여 생체내에서 생성시킴으로써 배양하거나 시험관내에서 배양할 수 있다. 특히 관심있는 것은 CVSP14의 촉매적 도메인을 인식하는 모노클로날 항체이다.

부가적으로, CVSP14의 지모겐 또는 이본쇄 형태를 사용하여, 입체 구조상 에피토프를 인식하는 모노클로날 항체를 만들 수 있다. 이어서, 목적하는 모노클로날 항체를 상기 배양 상등액 또는 복수 상등액으로부터 회수할 수 있다. 면역학적으로 중요한 부분을 함유하는 모노클로날 또는 폴리클로날 항혈청의 단편을 길항제로서 뿐만 아니라 본래의 항체로서 사용할 수 있다. 면역학적 반응성 단편, 예를 들면, Fab, Fab' 또는 $F(ab')_2$ 단편을 특히 치료학적 맥락에서 종종 사용하는데, 이는 이들 단편이 일반적으로, 완전한 면역글로불린 보다 덜 면역원성이기 때문이다.

항체 또는 단편을 생성시킬 수도 있다. 수용체의 목적하는 영역과 특이적으로 결합하는 영역을, 다중 종 기원을 갖는 키메라의 맥락에서 생성시킬 수도 있다.

상기 방법에서 검정되는 제제는 무작위로 선별하거나 또는 이성적으로 선별 또는 고안할 수 있다.

이러한 제제는, 예를 들어, 펩티드, 작은 분자 및 탄수화물일 수 있다. 당업자는 이들 제제의 구조적 성질에 관한 제한사항이 없다는 것을 용이하게 인식할 수 있다.

펩티드 제제는 당해 분야에 공지된 바와 같이, 표준 고체상(또는 용액상) 펩티드 합성 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 또한, 이들 펩티드를 암호화하는 DNA는 시판용 올리고뉴클레오티드 합성 기구를 사용하여 합성할 수 있고, 표준 재조합 생성 시스템을 사용하여 재조합적으로 생성시킬 수 있다. 고체상 펩티드 합성을 이용한 생성은, 비-유전자-암호화된 아미노산을 포함시켜야 하는 경우에 필수적이다.

G. CVSP14 폴리펩티드의 한 가지 이상의 활성을 조절하는 시험 물질의 선별 및 검정 포맷

CVSP14의 한 가지 이상의 활성을 조절하는 제제를 동정하는 방법이 제공된다. 이러한 방법에는 파아지 디스플레이(phage display) 및 CVSP14의 활성 변화를 평가하는 기타 방법이 포함된다. 이러한 방법 또는 검정은 목적하는 활성을 모니터 또는 검출하는 어떠한 수단도 이용할 수 있다. 각종 형태 및 검출 프로토콜이 스크리닝 검정 수행용으로 공지되어 있다. CVSP14 폴리펩티드 활성 조절제를 동정하도록 상기 포맷과 프로토콜을 변용시킬 수 있다. 프로토콜의 예에 관한 논의가 다음에 제시된다.

1. 고 처리량 스크리닝 검정

단일 CVSP14 폴리펩티드를 스크리닝하고/하거나 단일 시험 물질을 한 가지 검정에서 스크리닝하는 상기 언급된 검정법이 수행될 수 있긴 하지만, 상 검정법은 전형적으로, 고 처리량 스크리닝 방식으로 수행하는데, 즉 다수의 SP 단백질을 스크리닝하고/하거나 다수의 시험 물질을 동시에 스크리닝한다[참조: High Throughput Screening : The Discovery of Bioactive Substances (Devline, Ed.) Marcel Dekker, 1997; Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1: 384-91 (1997); and Silverman et et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 397-403 (1998)]. 예를 들면, 검정을 다중-웰(예를 들면, 24-, 48-, 96-, 384-, 1536-웰 또는 보다 높은 밀도), 칩 또는 어레이 포맷으로 수행할 수 있다.

고-처리량 스크리닝(HTS)은 '적중(hits)'을 동정하기 위해 질병 표적에 대해 다수의 각종 화학적 구조물을 시험하는 과정이다[참조: Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1: 384-91 (1997)]. 현 기술 수준의 HTS 작동은 샘플 제제를 취급하고, 검정 과정 및 후속 대용량 데이터 처리과정을 위해 고도로 자동화된 것이며 이에 컴퓨터를 사용된다.

고-처리량 스크린에 이용된 검출 기술은 연구되는 생화학적 경로의 유형에 좌우된다[참조: Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1: 384-91 (1997)]. 이들 방법에는 방사성화학 방법, 예를 들면, 각종 효소 검정에 적응시킬 수 있는 신틸레이션 근접 검정(SPA)[참조: Lerner et al., J. Biomol. Screening, 1: 135-143 (1996); Baker et al., An

al. Biochem., 239: 20-24 (1996); Baum et al., Anal. Biochem., 237: 129-134 (1996); and Sullivan et al., J. Biomol. Screening 2: 19-23 (1997)] 및 단백질-단백질 상호작용 검정[참조: Braunwalder et al., J. Biomol. Screening 1 : 23-26 (1996); Sonatore et al. Anal. Biochem. 240: 289-297 (1996); and Chen et al., J. Biol. Chem. 271 : 25308-25315 (1996)]; 및 비색 및 발광 검출법, 공명 에너지 전이(RET) 방법, 시간-분해된 형광성(HTRF) 방법, 세포-이용 형광성 검정, 예를 들면, 형광성 공명 에너지 전이(FRET) 과정[참조: Gonzalez et al., Biophys. J., 69 : 1272-1280 (1995)], 형광성 분극 또는 이방성 방법[참조: Jameson et al., Methods Enzymol. 246 : 283-300 (1995); Jolley, J. Biomol. Screening 1 : 33-38 (1996); Lynch et al., Anal. Biochem. 247: 77-82 (1997)], 형광성 상관 분광법(FCS), 및 기타 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 비-동위원소적 검출 방법이 포함된다.

2. 시험 물질

작은 분자, 항체, 단백질, 핵산, 펩티드, 및 이의 라이브러리 및 집합물을 포함한 시험 화합물은, CVSP14 폴리펩티드의 활성을 조절해주는 화합물을 동정하기 위한 상기 언급된 검정 및 다음에 기재되는 검정에서 스크리닝할 수 있다. 컴퓨터 를 이용한 화학에 의존하는 합리적인 약물 고안 방법론을 사용하여, 후보 화합물을 스크리닝 및 동정할 수 있다.

이러한 스크리닝 방법에 의해 동정된 화합물에는 억제제(길항제 포함)가 포함되고, 이는 효능제일 수 있다. 스크리닝하기 위한 화합물에는 입수 가능하거나, 공지되어 있거나 제조될 수 있는 모든 화합물 및 화합물의 집합물이 포함된다.

a. 화합물의 선별

화합물을 대상으로 하여, 세린 프로테아제, 특히 CVSP14 폴리펩티드의 억제 선별성 및 효능에 대해 선별할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 및 일반적으로 공지된 바와 같이, 표적 세린 프로테아제와 이의 기질을, 이러한 프로테아제와 이의 기질 간의 반응을 허용해주는 검정 조건하에 조합한다. 이 검정은 시험 화합물의 부재 및 증가 농도의 시험 화합물의 존재하에 수행한다. 세린 프로테아제 활성의 50%가 시험 화합물에 의해 억제되는 시험 화합물의 농도가, 이러한 화합물에 대한 IC_{50} 값(억제 농도) 또는 EC_{50} 값(유효 농도)이다. 시험 화합물 시리즈 또는 그룹 내에서, 보다 낮은 IC_{50} 값 또는 EC_{50} 값을 갖는 화합물이, 보다 높은 IC_{50} 값 또는 EC_{50} 값을 갖는 화합물 보다 더 강력한 세린 프로테아제의 억제제인 것으로 간주된다. IC_{50} 값 측정은 보다 간단한 검정에 종종 사용되는 반면, EC_{50} 값 측정은 보다 복잡한 검정, 예를 들면, 세포를 이용하는 검정에 종종 사용된다.

전형적으로, 후보 화합물은 CVSP14 폴리펩티드 활성의 억제에 대한 시험관내 검정에서 측정된 바와 같이 IC_{50} 값이 100nM 이하이다. 시험 화합물을 대상으로 하여, 이의 세린 프로테아제에 대한 선택도를 평가한다. 본원에 기재된 바와 같이, 및 일반적으로 공지된 바와 같이, 시험 화합물을 대상으로 하여, 이의 세린 프로테아제 패널 및 기타 효소에 대한 효능에 대해 검정하고, 각 검정 시스템에서 각 시험 화합물에 대한 IC_{50} 값 또는 EC_{50} 값을 결정한다. 표적 효소, 예를 들면, CVSP14 폴리펩티드에 대한 낮은 IC_{50} 값 또는 EC_{50} 값을 나타내는 화합물, 및 시험 패널 내의 기타 효소(예: 우로키나제 조직 플라스미노겐 활성화제, 트롬빈, 인자 Xa)에 대한 보다 높은 IC_{50} 값 또는 EC_{50} 값이 표적 효소에 대해 선택적인 것으로 간주된다. 일반적으로, 표적 효소 검정에서의 IC_{50} 값 또는 EC_{50} 값이 효소의 선택도 패널에서 측정된 가장 작은 IC_{50} 값 또는 EC_{50} 값 보다 적은 순서 중의 적어도 하나인 경우에, 특정 화합물은 선택성인 것으로 간주된다.

화합물을 대상으로 하여, 또한 이의 생체내 활성을 평가한다. 시험 화합물을 평가하기 위해 선택된 검정의 유형은 이러한 화합물의 사용에 의해 치료 또는 예방하고자 하는 병리학적 질환 뿐만 아니라 시험 화합물에 대해 평가하고자 하는 투여 경로에 좌우된다.

예를 들면, CVSP14 폴리펩티드의 억제를 통하여 종양 성장을 저하시키는 화합물의 활성을 평가하기 위해, PAI-1을 평가하는 것으로 문헌[참조: Jankun et al., Canc. Res. 57:559-563 (1997)]에 기재된 과정을 이용할 수 있다. 간략하게 언급하면, ATCC 세포주 DU145 및 LnCaP를 SCID 마우스에게 주사한다. 종양이 정착된 후, 해당 화합물의 시험관내 특정으로부터 결정된 투여량 섭생에 따라서 상기 마우스에게 시험 화합물을 제공한다. 상기 문헌의 화합물을 수중에서 투여한다. 약 5주 동안 매주 2회씩 종양 용적을 측정한다. 시험 화합물이 투여된 동물이, 적당한 대조 화합물이 투여된 동물과 비교해서 감소된 종양 용적을 나타내는 경우에, 해당 화합물은 활성인 것으로 간주된다.

종양 용적을 감소시키는데 대한 p-아미노벤즈아미딘(이는 돼지의 프로테아제 억제제이다)의 효과를 평가하도록 고안된 또 다른 생체내 실험 모델이 문헌[참조: Billstrom et al., Int. J. Cancer 61:542-547 (1995)]에 기재되어 있다.

전이 발생을 감소시키거나 전이를 억제시키는 화합물의 능력을 평가하기 위해, 문헌[참조: Kobayashi et al., Int. J. Canc. 57:727-733d (1994)]에 기재된 과정을 이용할 수 있다. 간략하게 언급하면, 쥐의 이종조직 이식편을 대상으로 하여, 정맥내 주사된 C57B1/6 마우스(실험적 전이) 또는 피하 주사된 복벽(자발적 전이)에서 높은 폐 전이증식 잠

재성에 대해 선별하였다. 시험하고자 하는 각종 농도의 화합물을 주사에 앞서, 매트리겔 내의 종양 세포와 혼합할 수 있다. 종양 접종한지 1 내지 6일 또는 7 내지 13일 후에, 시험 화합물을 매일 복강내 주사한다. 종양 접종한지 약 3주 또는 4주 후에 동물을 희생시키고, 폐 종양 콜로니를 계수한다. 생성된 데이터를 평가함으로써, 시험 화합물의 효능, 최적의 투여량 및 투여 경로를 결정할 수 있다.

종양 용적 및 전이를 감소시키는데 있어서의 시험 화합물의 활성은 문헌[참 조: Rabbani et al., Int. J. Cancer 63:840-845 (1995)]에 기재된 모델에서 평가하여 이들의 억제제를 평가할 수 있다. 여기서는, Mat LyLu 종양 세포를 코펜하겐(Copenhagen) 랫트의 옆구리 내로 주사한다. 상기 동물에게 삼투압 미니펌프를 이식하여, 3주까지 각종 용량의 시험 화합물을 지속적으로 투여한다. 실험 동물과 대조 동물의 종양 질량과 용적을 실험 기간 동안 평가하고, 전이적 성장도 평가한다. 생성된 데이터를 평가함으로써, 시험 화합물의 효능, 최적의 투여량 및 투여 경로를 결정할 수 있다. 이들 저자 중의 몇몇이 관련 프로토콜을 문헌[참조: Xing et al., Canc. Res. 57: 3585-3593 (1997)]에 기재하였다.

화합물의 항-혈관형성 활성을 평가하기 위해, 토끼 각막 혈관신생 모델을 이용할 수 있다[참조: Avery et al., (1990) Arch. Ophthalmol., 108: 1474-147]. 상기 문헌에는 뉴질랜드산 백색종 토끼를 마취시킨 다음, 중앙 각막을 절개하고, 방사상 각막 포켓을 형성시키는 과정이 기재되어 있다. 서방출 프로스타글란딘 펠릿을 상기 포켓에 놓아 두어 혈관신생을 유도시킨다. 시험 화합물을 5일 동안 복강내 투여하고, 이때 동물을 희생시킨다. 시험 화합물의 효과는 각막윤부(limbus)를 주기적으로 사진 촬영하여 이를 고찰함으로써 평가하는데, 상기 각막윤부를 사용하여 신생혈관 반응 면적을 산정하고, 이에 따라 경계 혈관신생 면적을 산정한다. 적당한 대조군에 비해 혈관신생 면적이 감소한다는 것은, 시험 화합물이 혈관신생을 감소 또는 억제시키는데 유효함을 나타낸다.

혈관형성 과정을 방지하는데 있어서의 시험 화합물의 효과를 평가하기 위해 사용된 혈관형성 모델이 문헌[참조: Min et al., Canc. Res. 56: 2428-2433 (1996)]에 기재되어 있다. 혈관형성-유도성 제제로서 bFGF를 함유하는 매트리겔 혼합물을 시험 화합물의 존재 및 부재하에 C57BL6 마우스에게 피하 주사한다. 5일 후, 동물을 희생시키고, 혈관신생을 가시화할 수 있는 매트리겔 플러그의 사진을 촬영한다. 매트리겔 및 유효량의 시험 화합물이 투여된 실험 동물은 대조군 동물, 또는 덜 유효하거나 전혀 유효하지 않는 용량의 화합물이 투여된 실험 동물 보다 혈관신생을 덜 나타낸다.

1차 종양의 확산을 제한하는 시험 화합물의 능력을 알아보기 위해 고안된 생체내 시스템이 다음 문헌에 기재되어 있다[참조: Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 5021-5025 (1993)]. CAT(클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제)를 발현하도록 공학적으로 처리된 종양 세포(PC3)를 누드 마우스에게 주사한다. 종양 크기 및/또는 전이를 감소시키는 능력을 알아보기 위해 시험하고자 하는 화합물을 상기 동물에게 투여한 다음, 종양 크기 및/또는 전이성 성장을 후속 측정한다. 또한, 각종 기관에서 검출된 CAT의 수준은 전이를 억제시키는 시험 화합물의 능력의 지표를 제공하고, 대조군 동물에 비해 처리된 동물의 조직에서 CAT가 덜 검출되는 것은 이러한 조직으로 이동된 CAT-발현성 세포가 적다는 것을 지시해준다.

고도로 침입성인 것으로 공지된 종양 세포주 F3II를 사용하여, 시험용 세린 프로테아제 억제제의 억제 효능을 평가해주는 생체내 실험 방식을 고안하였다[참조: Alonso et al., Breast Canc. Res. Treat. 40: 209-223 (1996)]. 상기 문헌에는 독성 결정, 종양 성장, 침입성, 자발적 전이, 실험적 폐 전이 및 혈관형성 검정에 대한 생체내 연구가 기재되어 있다.

문헌[참조: L. Ossowski in 1998 (J. Cell. Biol. 107: 2437-2445 (1988)]에 처음으로 기재된 CAM 모델(병아리 배아 융모요막 모델)은 시험 화합물의 억제 활성을 평가하기 위한 또 다른 방법을 제공해준다. CAM 모델에서는, 종양 세포가 CAM을 함유하는 융모요막을 통하여 침입하는데, 몇 가지 세린 프로테아제 억제제의 존재하에서의 종양 세포는 이러한 막을 통한 침입이 저하되었거나 전혀 이루어지지 않았다. 따라서, CAM 검정은 각종 농도의 시험 화합물의 존재하 및 부재하에 CAM 및 종양 세포를 사용하여 수행한다. 종양 세포의 침입성은 상기 화합물의 억제 활성을 지시해주는 조건하에 측정한다. 억제 활성을 나타내는 화합물을 종양 침입성 저하와 상관이 있다.

CAM 모델은 또한, 혈관형성의 표준 검정(즉, 새로운 혈관 형성에 대한 효과)에 사용된다[참조: Brooks et al., Methods in Molecular Biology 129: 257-269 (1999)]. 이러한 모델에 따라서, 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFDG)와 같은 혈관형성 유도제를 함유하는 필터 디스크를 CAM 위에 놓아둔다. 사이토킨을 CAM 내로 확산시키면 국부적 혈관형성이 유도되는데, 이는 필터 디스크 바로 아래의 CAM 내의 혈관 분지점의 수를 계수하는 것과 같은 몇 가지 방식으로 측정할 수 있다. 이 모델을 사용하여, 사이토킨-유래된 혈관형성을 억제시키는 상기 동정된 화합물의 능력을 시험할 수 있다. 시험 화합물을, 상기 혈관형성 유도체를 함유하는 필터 디스크에 가하거나, 막 위에 직접 놓아두거나 또는 전신 투여할 수 있다. 시험 화합물의 존재하 및/또는 부재하에서의 새로운 혈관 형성 정도는 상기 모델을 사용하여 비교할 수 있다. 시험 화합물의 존재하에 보다 적은 수의 새로운 혈관이 형성 된다는 것은 항-혈관형성 활성을 지시해줄 것이다. CVSP14 폴리펩티드의 억제제에 대한 항-혈관형성 활성을 나타낸다는 것은 상기 SP 단백질에 대한 혈관형성에서의 역할을 지시해준다.

b. 공지된 세린 프로테아제 억제제

스크리닝하기 위한 화합물은 세린 프로테아제 억제제일 수 있고, 이를 대상으로 하여, CVSP14의 활성을 억제시키는 이의 능력에 대해 시험할 수 있다. 스크리닝 검정에 사용하기 위한 세린 프로테아제 억제제의 예에는 세린 프로테아제 억제제(SPI-3)[참조: Chen, et al. Citokine, 11: 856-862 (1999); 아프로티닌(Aprotinin)[참조: Iijima, R., et al., J. Biochem. (Tokyo) 126: 912- 916 (1999)]; 카잘-유형 세린 프로테아제 억제제-유사 단백질[참조: Niimi, et al. Eur. J. Biochem., 266: 282-292 (1999)]; 쿠니츠-유형 세린 프로테아제 억제제[참조: Ravichandran, S., et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 55: 1814-1821 (1999)]; 조직 인자 경로 억제제-2/매트릭스-연합된 세린 프로테아제 억제제(TFPI-2/MSPI)[참조: Liu, Y. et al. Arch. Biochem. Biophys. 370: 112-8 (1999)]; 부키닌[참조: Cui, C. Y. et al. J. Invest. Dermatol. 113: 182-8 (1999)]; 나프모스타트 메실레이트[참조: Ryo, R. et al. Vox Sang. 76: 241-6 (1999)]; TPCK[참조: Huang et al. Oncogene 18: 3431-3439 (1999); 합성 무명-결합된 세린 프로테아제 억제제[참조: Edwards et al. Wound Repair Regen. 7: 106-18 (1999)]; FUT-175[참조: Sawada M. et al. Stroke 30: 644-50 (1999)]; 세린 프로테아제 억제제 FUT-0175와 트롬복산 신테타제 억제제 OKY-046의 조합물[참조: Kaminogo et al. Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 38: 704-8; discussion 708-9 (1998)]; 랫트 세린 프로테아제 억제제 2.1 유전자[참조: LeCam, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253: 311-4 (1998)]; 그랜자임 B와의 랫트 뇌하수체선 복합체에서 발현된 새로운 세포내 세린 프로테아제 억제제[참조: Hill et al. FEBS Lett. 440: 361-4 (1998)]; 3,4-디클로로이소쿠마린[참조: Hammed et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 219: 132-7 (1998)]; LEX032[참조: Bains et al. Eur. J. Pharmacol. 356: 67-72 (1998)]; N-토실-L-페닐알라닌 클로로메틸 케톤[참조: Dryjanski et al. Biochemistry 37: 14151-6 (1998)]; 세린 프로테아제 억제제 뉴로세르핀(P112)에 대한 마우스 유전자[참조: Berger et al. Gene, 214: 25-33 (1998)]; 랫트 세린 프로테아제 억제제 2.3 유전자[참조: Paul et al. Eur. J. Biochem. 254: 538-46 (1998)]; 에코틴(Ecotin)[참조: Yang et al. J. Mol. Biol. 279: 945-57 (1998)]; 14 kDa 식물-관련된 세린 프로테아제 억제제[참조: Roch et al. Dev. Comp. Immunol. 22 (1): 1-12 (1998)]; 매트릭스-연합된 세린 프로테아제 억제제 TFPI-2/33 kDa MSPI[참조: Rao et al. Int. J. Cancer 76: 749-56 (1998)]; ONO-3403[참조: Hiwasa et al. Cancer Lett. 126: 221-5 (1998)]; 브델라스타신[참조: Moser et al. Eur. J. Biochem. 253: 212-20 (1998)]; 비쿠닌(Bikunin)[참조: Xu et al. J. Mol. Biol. 276: 955-66 (1998); 나파모스타트 메실레이트[참조: Mellgren et al. Thromb. Haemost. 79 : 342-7 (1998)]; 성장 호르몬 의존적 세린 프로테아제 억제제, Spi 2.1[참조: Maake et al. Endocrinology 138 : 5630-6 (1997)]; 성장 인자 활성화제 억제제 유형 2, 쿠니츠-유형 세린 프로테아제 억제제[참조: Kawaguchi et al. J. Biol. Chem., 272: 27558-64 (1997)]; 데저트 로커스트(desert locust), 쉬스토세르가 그레가리아(Schistocerga gregaria)의 난소로부터의 열 안정성 세린 프로테아제 억제제[참조: Hamdaoui et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 238 : 357-60 (1997)]; 사람 태반 간세포 성장 인자 활성화제 억제제, 쿠니츠-유형 세린 프로테아제 억제제[참조: Shimomura et al. J. Biol. Chem. 272: 6370-6 (1997)]; FUT-187, 경구 세린 프로테아제 억제제[참조: Shiozaki et al. Gan To Kaguku Ryoho, 23(14): 1971-9 (1996)]; 세포외 매트릭스-연합된 세린 프로테아제 억제제[참조: Mr 33,000, 31,000, 및 27,000 (Rao, C. N., et al., Arch. Biochem. Biophys., 335: 82-92 (1996)]; 비가역적 이소쿠마린 세린 프로테아제 억제제[참조: Palencia, D. D., et al., Biol. Reprod., 55: 536-42 (1996); 4-(2-아미노에틸)-벤젠설포닐 플루오라이드(AEBSF)[참조: Nakabo et al. J. Leukoc. Biol. 60: 328-36 (1996)]; 뉴로세르핀(Neuroserpin)[참조: Osterwalder, T., et al., EMBO J. 15: 2944-53 (1996)] ; 사람 세린 프로테아제 억제제 알파-1-안티트립신[참조: Forney et al. J. Parasitol., 82 : 496-502 (1996)]; 랫트 세린 프로테아제 억제제 2.3[참조: Simar-Blanchet, A. E., et al., Eur. J. Biochem 236: 638-48 (1996)]; 게박세이트 메실레이트[참조: parodi, F., et al., J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. 10: 235-7 (1996)]; 재조합 세린 프로테아제 억제제, CPTI II[참조: Stankiewicz, M., et al., (Acta Biochim. Pol., 43(3) : 525-9 (1996)]; 시스테인-풍부한 세린 프로테아제 억제제(Guamerin 11)[참조: Kim, D. R., et al., J. Enzym. Inhib., 10: 81-91 (1996)]; 디이소프로필플루 오로포스페이트[참조: Lundqvist, H., et al., Inflamm. Res., 44 (12): 510-7 (1995)]; 넥신(Nexin) 1 [참조: Yu, D. W., et al., J. Cell Sci., 108 (Pt 12): 3867-74 (1995)]; LEX032[참조: Scalia, R., et al., Shock, 4(4): 251-6 (1995)]; 프로테아제 넥신 1[참조: Houenou, L. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92(3): 895-9 (1995)]; 키마제-지시된 세린 프로테아제 억제제[참조: Woodard S. L., et al., J. Immunol., 153(11): 5016-25 (1994)]; N-알파-토실-L-리실-클로로메틸 케톤(TLCK)[참조: Bourinbaiar, A. S., et al., Cell Immunol., 155(1): 230-6 (1994)]; Smpi56[참조: Ghendler, Y., et al., Exp. Parasitol., 78(2): 121-31 (1994)]; 쉬스토소마 해마토븀 세린 프로테아제[참조: Blanton, R. E., et al., Mol. Biochem. Parasitol., 63(1): 1-11 (1994)]; Spi-1[참조: Warren, W. C., et al., Mol. Cell Endocrinol., 98(1): 27-32 (1993)]; TAME[참조: Jessop, J. J., et al., Inflammation, 17(5): 613-31 (1993)]; 안티트롬빈 III[참조: Kalaria, R. N., et al., Am. J. Pathol., 143(3): 886-93 (1993)]; FOY-305[참조: Ohkoshi, M., et al., Anticancer Res., 13(4): 963-6 (1993)]; 카모스타트 메실레이트[참조: Senda, S., et al., Intern. Med., 32(4): 350-4 (1993)]; 색소 상피-유래된 인자[참조: Steele, F. R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90(4): 1526-30 (1993)]; 안티스타신[참조: Holstein, T. W., et al., FEBS Lett., 309(3): 288-92 (1992)]; 세린 프로테아제 억제제를 암호화하는 백시니아 바이러스 K2L 유전자[참조: Zhou, J., et al., Virology, 189(2): 678-86 (1992)]; 바우만-비르크(Bowman-Birk) 세린 프로테아제 억제제[참조: Werner, M. H., et al., J. Mol. Biol., 225(3): 873-89 (1992)]; FUT-175[참조: Yanamoto, H., et al., Neurosurgery, 30(3): 358-63 (1992)]; FUT-175[참조: Yanamoto, H., et al., Neurosurgery, 30 (3): 351-6, discussion 356-7 (1992)]; PAI-I[참조: Yreadwell, B. V., et al., J. Orthop. Res., 9(3): 309-16 (1991)]; 3,4-디클로로이소쿠마린[참조: Rusbridge, N. M., et al., FEBS Lett., 268(1): 133-6 (1990)]; 알파 1-안티키모트립신[참조: Lindmark, B. E., et al., Am. Rev

. Respir. Des., 141(4 Pt 1): 884-8 (1990)]; P-톨루엔설포닐-L-아르기닌 메틸 에스테르(TAME)[참조: Scuderi, P., J. Immunol., 143(1) : 168-73 (1989)]; 알파 1-안티키모트립신[참조: Abraham, C. R., et al., Cell, 52(4): 487-501 (1988)]; 콘트랍신[참조: Modha, J., et al., Parasitology, 96(Pt 1): 99-109 (1988)]; 알파 2-안티플라스민[참조: Holmes, W. E., et al., J. Biol. Chem., 262(4): 1659-64 (1987)]; 3,4-디클로로이소쿠마린[참조: Harper, J. W., et al., Biochemistry, 24(8): 1831-41 (1985)]; 디이소프로필플루오로포스페이트[참조: Tsutsui, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 123(1): 271-7 (1984)]; 가벡세이트 메실레이트[참조: Hesse, B., et al., Pharmacol. Res. Commun., 16(7): 637-45 (1984)]; 페닐 메틸 설포닐 플루오라이드[참조: Dufer, J., et al., Scand. J. Haematol., 32(1): 25-32 (1984)]; 프로테아제 억제제 CI-2[참조: McPhalen, C. A., et al., J. Mol. Biol., 168 (2): 445-7 (1983)]; 페닐메틸설포닐 플루오라이드[참조: Sekar V., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 89(2): 474-8 (1979)]; PGE1[참조: Feinstein, M. D., et al., Prostaglandine, 14(6): 1075-93 (1977)]이 포함되지 만, 이에 제한되지 않는다.

c. 조합 라이브러리 및 기타 라이브러리

스크리닝 검정용 화합물의 공급원은 조합 라이브러리를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 라이브러리일 수 있다. 조합 라이브러리의 합성 방법 및 이러한 조합 라이브러리의 특징은 당해 분야에 공지되어 있다[참조: Combinatorial Libraries : Synthesis, Screening and Application Potential (Cortese Ed.) Walter de Gruyter, Inc., 1995; Tietze and Lieb, Curr. Opin. Chem. Biol., 2(3): 363-71 (1998); Lam, Anticancer Drug Des., 12(3): 145-67 (1997); Blaney and Martin, Curr. Opin. Chem. Biol., 1(1): 54-9 (1997); and Schultz and Schultz, Biotechnol. Prog., 12(6): 729-43 (1996)].

분자 생물학 방법 및/또는 동시 화학적 합성 방법론을 사용하여, 다양한 라이브러리, 주로 펩티드계 및 뉴클레오티드계 올리고머 라이브러리를 생성시키기 위한 방법 및 전략을 개발하였다[참조: Dower et al., Annu. Rep. Med. Chem., 26: 271-280 (1991); Fodor et al., Science, 251: 767-773 (1991); Jung et al., Angew. Chem. Ind. Ed. Engl., 31: 367-383 (1992); Zuckerman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4505- 4509 (1992); Scott et al., Science, 249: 386-390 (1990); Devlin et al., Science, 249: 404-406 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378-6382 (1990); and Gallop et al., J. Medicinal Chemistry, 37: 1233-1251 (1994)]. 생성된 조합 라이브러리는 잠재적으로 수 백만개의 화합물을 함유하고, 선택된 활성을 나타내는 화합물을 동정하기 위해 스크 리닝 될 수 있다.

라이브러리는 대략 3가지 카테고리로 나눈다: 무작위 펩티드 또는 단백질이 플라스미드로부터 발현된 파아지 입자 또는 단백질의 표면 상에 존재하는 융합-단백질-표시된 펩티드 라이브러리; 개개의 화합물 또는 화합물의 혼합물이 불용성 매트릭스, 예를 들면, 수지 비드[참조: Lam et al., Nature, 354:82-84 (1991)] 및 무명 지지체[참조: Eichler et al., Biochemistry 32: 11035-11041 (1993)] 상에 존재하는 지지체-결합된 합성 화학적 라이브러리; 및 화합물이 용액 중에서 사용되는 방법[참조: Houghten et al., Nature, 354: 84-86 (1991); Houghten et al., BioTechniques, 313: 412-421 (1992); and Scott et al., Curr. Opin. Biotechnol., 5: 40-48 (1994)]. 합성 펩티드 및 올리고뉴클레오티드 조합 라이브러리에 관한 수 많은 예가 있으며, 비-펩티드성 작은 유기 분자를 함유하는 라이브러리를 제조하는 많은 방법이 있다. 이러한 라이브러리는 조합하여 다양한 유기 분자의 혼합물을 형성하거나 또는 조합하여 선별된 약물작용발생단(pharmacophore) 단량체에 근거하여 라이브러리를 형성하는 기준 단량체 세트에 기초할 수 있다.

무작위 또는 결정적 조합 라이브러리는 본원에 기재된 방법 및/또는 청구된 스크리닝 방법에 의해 스크리닝할 수 있다. 이들 두 라이브러리 중의 어느 것에서도, 라이브러리의 각 단위를 분리 및/또는 고체 지지체 상에 고정화시킨다. 결정적 라이브러리에서는, 각 고체 지지체 상에서의 특정한 단위의 위치가 앞서 공지되어 있다. 무작위 라이브러리에서는, 특정한 단위의 위치가 앞서 공지되어 있지 않지만, 각 부위는 독특한 단일 단위를 여전히 함유하고 있다. 라이브러리를 제조하 는 많은 방법이 당업자에게 공지되어 있다[참조: Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3998-4002 (1984), Houghten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5131-5135 (1985)]. 당업자에게 공지된 모든 기술에 의해 생성된 조합 라이브러리가 스크리닝에 고려된다[참조: Table 1 of Schultz and Schultz, Biotechnol. Prog., 12(6): 729-43 (1996); Bartel et al., Science, 261:1411-1418 (1993); Baumbach et al. BioPharm, (Can):24-35 (1992); Bock et al. Nature, 355:564-566 (1992); Borman, S., Combinatorial chemists focus on samll molecules molecular recognition, and automation, Chem. Eng. News, 2(12):29 (1996); Boublik, et al., Eukaryotic Virus Display: Engineering the Major Surface Glycoproteins of the Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus (ACNPV) for the Presentation of Foreign Proteins on the Virus Surface, Bio/Technology, 13:1079-1084 (1995); Brenner, et al., Encoded Combinatorial Chemistry, Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A., 89:5381-5383 (1992); Caflisch, et al., Computational Combinatorial Chemistry for De Novo Ligand Design: Review and Assessment, Perspect. Drug Discovery Des., 3:51-84 (1995); Cheng, et al., Sequence-Selective Peptide Binding with a Peptido-A,B-trans-steroidal Receptor Selected from an Encoded Combinatorial Library, J. Am. Chem. Soc., 118:1813-1814 (1996); Chu, et al., Affinity Capillary Electrophoresis to Identify the Peptide in A Peptide Library that Binds Most Tightly to Vancomycin, J. Org. Chem., 58:648-652 (1993); Clackson, et al

., Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries, Nature, 352:624-628 (1991); Combs, et al., Protein Structure-Based Combinatorial Chemistry: Discovery of Non-Peptide Binding Elements to Src SH3 Domain, J. Am. Chem. Soc., 118:287-288 (1996); Cwirla, et al., Peptides On Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:6378-6382 (1990); Ecker, et al., Combinatorial Drug Discovery: Which Method will Produce the Greatest Value, Bio/Technology, 13:351-360 (1995); Ellington, et al., In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands, Nature, 346:818-822 (1990); Ellman, J.A., Variants of Benzodiazephines, J. Am. Chem. Soc., 114:10997 (1992); Erickson, et al., The Proteins; Neurath, H., Hill, R.L., Eds.: Academic: New York, 1976; pp. 255-257; Felici, et al., J. Mol. Biol., 222:301-310 (1991); Fodor, et al., Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis, Science, 251:767-773 (1991); Francisco, et al., Transport and Anchoring of Beta-Lactamase to the External Surface of E. Coli., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:2713-2717 (1992); Georgiou, et al., Practical Applications of Engineering Gram-Negative Bacterial Cell Surfaces, TIBTECH, 11:6-10 (1993); Geysen, et al., Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Glaser, et al., Antibody Engineering by Condon-Based Mutagenesis in a Filamentous Phage Vector System, J. Immunol., 149:3903-3913 (1992); Gram, et al., In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library, Proc. Natl. Acad. Sci., 89:3576-3580 (1992); Han, et al., Liquid-Phase Combinatorial Synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:6419-6423 (1995); Hoogenboom, et al., Multi-Subunit Proteins on the Surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody (Fab) Heavy and Light Chains, Nucleic Acids Res., 19:4133-4137 (1991); Houghten, et al., General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:5131-5135 (1985); Houghten, et al., The Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for the Determination of Peptide Ligands in Radio-Receptor Assays-Opiod-Peptides, Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:405-412 (1993); Houghten, et al., Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery, Nature, 354:84-86 (1991); Huang, et al., Discovery of New Ligand Binding Pathways in Myoglobin by Random Mutagenesis, Nature Struct. Biol., 1:226-229 (1994); Huse, et al., Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda, Science, 246:1275-1281 (1989); Janda, K.D., New Strategies for the Design of Catalytic Antibodies, Biotechnol. Prog., 6:178-181 (1990); Jung, et al., Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 31:367-486 (1992); Kang, et al., Linkage of Recognition and Replication Functions By Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:4363-4366 (1991a); Kang, et al., Antibody Redesign by Chain Shuffling from Random Combinatorial Immunoglobulin Libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:11120-11123 (1991b); Kay, et al., An M13 Phage Library Displaying Random 38-Amino-Acid-Peptides as a Source of Novel Sequences with Affinity to Selected Targets Genes, Gene, 128:59-65 (1993); Lam, et al., A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, Nature, 354:82-84 (1991) (published errata apear in Nature, 358:434 (1992) and Nature, 360:768 (1992); Lebl, et al., One Bead One Structure Combinatorial Libraries, Biopolymers (Pept. Sci.), 37:177-198 (1995); Lerner, et al., Antibodies without Immunization, Science, 258:1313-1314 (1992); Li, et al., Minimization of a Polypeptide Hormone, Science, 270:1657-1660 (1995); Light, et al., Display of Dimeric Bacterial Alkaline Phosphatase on the Major Coat Protein of Filamentous Bacteriophage, Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:1073-1079 (1992); Little, et al., Bacterial Surface Presentation of Proteins and Peptides: An Alternative to Phage Technology, Trends Biotechnol., 11:3-5 (1993); Marks, et al., By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Matthews, et al., Substrate Phage: Selection of Protease Substrates by Monovalent Phage Display, Science, 260:1113-1117 (1993); McCafferty, et al., Phage Enzymes: Expression and Affinity Chromatography of Functional Alkaline Phosphatase on the Surface of Bacteriophage, Protein Eng., 4:955-961 (1991); Menger, et al., Phosphatase Catalysis Developed Via Combinatorial Organic Chemistry, J. Org. Chem., 60:6666-6667 (1995); Nicolaou, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 34:2289-2291 (1995); Oldenburg, et al., Peptide Ligands for A Sugar-Binding Protein Isolated from a Random Peptide Library, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:5393-5397 (1992); Parmley, et al., Antibody-Selectable Filamentous fd Phage Vectors: Affinity Purification of Target Genes, Genes, 73:305-318 (1988); Pinilla, et al., Synthetic Peptide Combinatorial Libraries (SPCLS)--Identification of the Antigenic Determinant of Beta-Endorphin Recognized by Monoclonal Antibody-3E7, Gene, 128:71-76 (1993); Pinilla, et al., Review of the Utility of Soluble Combinatorial Libraries, Biopolymers, 37:221-240 (1995); Pistor, et al., Expression of Viral Hemegglutinan On the Surface of E. Coli., Klin. Wochenschr., 66:110-116 (1989); Pollack, et al., Selective Chemical Catalysis by an Antibody, Science, 234:1570-1572 (1986); Rigler, et al., Fluorescence Correlations, Single Molecule Detection and Large Number Screening: Applications in Biotechnology, J. Biotechnol., 41:177-186 (1995); Sarvetnick, et al., Increasing the Chemical Potential of the Germ-Line Antibody Repertoire, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:4008-4011 (1993); Sastry, et al., Cloning of the Immunological Repertiore in Escherichia Coli for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cD

NA Library, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:5728-5732 (1989); Scott, et al., Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library, Science, 249:386-390 (1990); Sears, et al., Engineering Enzymes for Bioorganic Synthesis: Peptide Bond Formation, Biotechnol. Prog., 12:423-433 (1996); Simon, et. al., Peptides: A Modular Approach to Drug Discovery, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:9367-9371 (1992); Still, et al., Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using Encoded Combinatorial Libraries, Acc. Chem. Res., 29:155-163 (1996); Thompson, et al., Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries, Chem. Rev., 96:555-600 (1996); Tramontano, et al., Catalytic Antibodies, Science, 234:1566-1570 (1986); Wrighton, et al., Small Peptides as Potent Mimetics of the Protein Hormone Erythropoietin, Science, 273:458-464 (1996); York, et al., Combinatorial mutagenesis of the reactive site region in plasminogen activator inhibitor I, J. Biol. Chem., 266:8595-8600 (1991); Zebedee, et al., Human Combinatorial Antibody Libraries to Hepatitis B Surface Antigen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:3175-3179 (1992); Zuckerman, et al., Identification of Highest-Affinity Ligands by Affinity Selection from Equimolar Peptide Mixtures Generated by Robotic Synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:4505-4509 (1992)].

예를 들면, CVSP14 폴리펩티드, 또는 SP 단백질의 프로테아제 도메인과 결합하는 펩티드는 파아지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 동정할 수 있다. 예시 양태에서는, 이러한 방법이 a) 파아지 라이브러리로부터의 파아지를 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인과 접촉시키는 단계; b) 상기 단백질과 결합하는 파아지를 분리하는 단계; 및 c) CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 펩티드를 동정하기 위해 상기 분리된 파아지에 의해 암호화된 하나 이상의 펩티드의 실체를 결정하는 단계를 포함한다.

H. CVSP14 폴리펩티드의 활성 조절제

기타 스크리닝 방법에서 CVSP14 폴리펩티드 또는 프로테아제 도메인을 사용하여 생성되거나 또는 스크리닝에 의해 동정된, CVSP14의 활성을 조절하는 화합물을 본원에 제공된다. 이들 화합물은 CVSP14 폴리펩티드와 직접적으로 상호작용함으로써 작용하거나 또는 이의 전사 또는 해독을 변화시킴으로써 작용한다. 이러한 분자에는 CVSP14 폴리펩티드, 특히 이의 프로테아제 도메인과 특이적으로 반응하는 항체; CVSP14 폴리펩티드의 발현을 변화시키는 안티센스 핵산 또는 이본쇄 RNA(dsRNA), 예를 들면, RNAi, 항체, 펩티드 모사체 및 기타 화합물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

1. 항체

본원에 제공된 CVSP14 폴리펩티드, 특히 이의 일본쇄 프로테아제 도메인, 또는 완전한 길이 또는 프로테아제 도메인의 활성화 형태 또는 지모겐 형태와 특이적으로 결합하는 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 포함하는 항체가 제공된다.

일반적으로, 항체는 모노클로날 항체이고, 전형적으로 항체는 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인와 특이적으로 결합한다. 특정 양태에서는, CVSP14의 프로테아제 도메인의 일본쇄 각각에 대한 항체가 제공된다. 또한, CVSP14의 모든 도메인 및 이의 이본쇄 형태와 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.

CVSP14 폴리펩티드, 및 이의 도메인, 단편, 상동체 및 유도체를 면역원으로서 사용하여, 이러한 면역원과 특이적으로 결합하는 항체를 생성시킬 수 있다. 이러한 항체에는 폴리클로날, 모노클로날, 키메릭, 일본쇄, Fab 단편, 및 Fab 발현 라이브러리가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서는, 사람 CVSP14 폴리펩티드에 대한 항체가 생성된다. 또 다른 양태에서는, 세린 프로테아제 도메인을 함유하는, CVSP14 폴리펩티드의 단편으로부터 형성된 복합체가 항체 생성을 위한 면역원으로서 사용된다.

당해 분야에 공지된 각종 과정이 CVSP14 폴리펩티드, 이의 도메인, 유도체, 단편 또는 동족체에 대한 폴리클로날 항체의 생성에 사용될 수 있다. 항체를 생성하기 위해, 천연의 CVSPP14 폴리펩티드, 또는 이의 합성 형태 또는 유도체, 예를 들면, 가교결합된 CVSP14 폴리펩티드를 주사함으로써 각종 숙주 동물을 면역시킬 수 있다. 이러한 숙주 동물에는 토끼, 마우스, 랫트 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 각종 아쥬반트를 사용하여, 숙주 종에 따라서 면역학적 반응을 증가 시킬 수 있으며, 이에는 프로인트(완전 및 불완전), 미네랄 겔, 예를 들면, 수산화알루미늄, 표면 활성 물질, 예를 들면, 리소레시킨, 플루로닉 폴리올, 폴리음이온, 펩티드, 오일 에멀션, 디니트로페놀, 및 잠재적으로 유용한 사람 아쥬반트, 예를 들면, 바실레 갈메테-게랑(BCG) 및 코리네박테륨 파르붐(corynebacterium parvum)이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

CVSP14 폴리펩티드, 또는 이의 도메인, 유도체, 단편 또는 동족체에 대해 지시된 모노클로날 항체를 제조하기 위해, 배양물 중의 연속 세포주에 의해 항체 분자의 생성을 제공해주는 어떠한 기술도 사용될 수 있다. 이러한 기술에는 콜러 및 밀슈타인(Kohler and Milstein)[참조: Nature 256: 495-497 (1975)]에 의해 최초로 개발된 하이브리도마 기술, 트리오마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술[참조: Kozbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983)], 및 사

람 모노클로날 항체를 생성시키는 EBV 하이브리도마 기술[참조: Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)]이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 부가의 양태에서는, 모노클로날 항체를, 최신 기술을 활용하는 무균 동물에서 생성시킬 수 있다(PCT/US90/02545). 사람 항체를 사용할 수 있고, 이는 사람 하이브리도마를 사용하거나[참조: Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030 (1983)] 또는 사람 B 세포를 시험관내에서 EBV 바이러스로 형질전환시킴으로써[참조: Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)] 수득할 수 있다. CVSP14 폴리펩티드에 특이적인 마우스 항체 분자로부터의 유전자를, 적당한 생물학적 활성의 사람 항체 분 자로부터의 유전자와 함께 스플라이싱함으로써, '키메릭 항체'[참조: Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314: 452-454 (1985)]를 생성하기 위해 개발된 기술을 사용할 수 있다.

일본쇄 항체의 제조에 대해 기재된 기술(미국 특허 제4,946,778호)을 변용시켜, CVSP14 폴리펩티드-특이적 일본쇄 항체를 생성할 수 있다. 부가의 양태는 Fab 발현 라이브러리의 작제를 위해 기재된 기술[참조: Hues et al., Science 246: 1275-1281 (1989)]을 사용하여, CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 도메인, 유도체 또는 동족체에 대한 목적하는 특이성을 지닌 모노클로날 Fab 단편을 신속하고도 용이하게 동정할 수 있다. 비-사람 항체는 공지된 방법(미국 특허 제5,225,539호 참조)에 의해 '사람화'시킬 수 있다.

CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체 단편은 당해 분야에 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 이러한 단편에는 항체 분자를 펩신 분해시킴으로써 생성될 수 있는 F(ab')2 단편; 이러한 F(ab')2 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 생성될 수 있는 Fab' 단편; 항체 분자를 파파인 및 환원제로 처리함으로써 생성될 수 있는 Fab 단편, 및 Fv 단편이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

항체를 생성하는데 있어서, 목적하는 항체에 대한 스크리닝은 당해 분야에 공지된 기술, 예를 들면, ELISA(효소 연결 면역흡착 검정)에 의해 수행될 수 있다. CVSP14 폴리펩티드의 특정 도메인에 특이적인 항체를 선별하기 위해, 이러한 도메 인을 함유하는 CVSP14 폴리펩티드의 단편과 결합하는 생성물에 대한 하이브리도마를 검정 생성시킬 수 있다.

전술된 항체는 CVSP14 폴리펩티드 단백질의 국재화 및/또는 정량화와 관련하여 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어, 이들 단백질을 영상화하고, 적당한 생리학적 샘플 중의 이의 수준을 예를 들면, 진단학적 방법으로 측정하는 방법에서 사용할 수 있다. 또 다른 양태에서는, 결합 도메인을 함유하는 항-CVSP14 폴리펩티드 항체 또는 이의 단편을 치료제로서 사용한다.

2. 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체

본원에는 SP 단백질의 활성을 조절하고 이와 결합하는 분자를 동정하는 방법이 제공된다. 이들 중에서, SP, 특히 이의 일본쇄 프로테아제 도메인 또는 촉매적 활성 단편과 결합하는 분자는 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체(사이클릭 펩티드 포함)이다. 펩티드 모사체는 CVSP14 폴리펩티드와 같은 표적 분자와 특이적으로 결합하는데 필수적인 리간드 또는 폴리펩티드의 분자상 입체형태를 모사하는 분자 또는 화합물이다. 예시 양태에서는, 상기 펩티드, 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체(들)는 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 결합된다. 이러한 펩티드 및 펩티드 모사체에는 CVSP14 폴리펩티드와 특이적으로 결합하고, 전형적으로 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 결합하는 항체의 것이 포함된다. 본원에 제공된 방법에 의해 동정된 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체(들)는 CVSP14 폴리펩티드의 효능제 또는 길항제일 수 있다.

상기 펩티드 및 펩티드 모사체는 포유동물에서 CVSP14 폴리펩티드 활성과 연 관된 질병 또는 장애를 진단, 치료, 예방 및 스크리닝하는데 유용하다. 또한, 상기 펩티드 및 펩티드 모사체는 CVSP14 폴리펩티드의 활성을 조절하거나, 또는 CVSP14 폴리펩티드, 일반적으로 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 특이적으로 결합하는 분자 또는 화합물을 동정, 분리, 및 정제하는데 유용하다. 저분자량 펩티드 및 펩티드 모사체는 표적 분자, 예를 들면, CVSP14 폴리펩티드 또는 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과의 강력한 결합 특성을 지닐 수 있다.

본원에 기재된 바와 같은 CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 사람을 포함한 포유동물에게 투여하여 CVSP14 폴리펩티드 활성을 조절할 수 있다. 따라서, 펩티드, 폴리펩티드 또는 펩티드 모사체 화합물을 상기 활성을 조절하기에 충분한 양으로 투여하는 것을 포함하여, 신생물성 질병을 치료 및 예방하는 방법이 제공된다. 따라서, 펩티드, 폴리펩티드 또는 펩티드 모사체 화합물을 치료학적 유효 용량 또는 양으로 피검자에게 투여하는, 상기 질병 또는 장애가 있는 피검자를 치료하는 방법이 또한 본원에 제공된다.

상기 펩티드, 폴리펩티드 또는 펩티드 모사체를 함유하는 조성물을 예방적 및/또는 치료학적 처리를 위해 투여할 수 있다. 치료학적 적용을 위해서는, 조성물을 상기 언급된 바와 같이 질병을 앓고 있는 환자에게, 이러한 질병과 합병증을 치료하기에 충분한 양 또는 적어도 이의 증상을 부분적으로 억제시키는 양으로 투여할 수 있다. 이러한 용도에 유

효한 양은 질병의 중증도 및 환자의 체중과 건강 상태에 좌우될 것이며, 이는 실험적으로 결정될 수 있다.

예방적 적용의 경우에는, 상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체를 함유 하는 조성물을 특정 질병에 걸리기 쉽거나 이러한 질병에 걸릴 위험이 있는 환자에게 투여한다. 이러한 양은 '예방적으로 유효한 용량'으로 규정된다. 이러한 용도에서의 정확한 양은 환자의 건강 상태와 체중에 좌우된다. 따라서, CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체를 사용하여, 활성 성분으로서 하나 이상의 상기 펩티드 또는 펩티드 모사체를 약제학적 담체 또는 희석제와 함께 함유하는 약제학적 조성물을 제조할 수 있다. 상기 화합물은 예를 들어, 경구, 폐, 비경구(근육내, 복강내, 정맥내(IV) 또는 피하 주사), 흡입(미세한 분말 제형을 통함), 피하, 비내, 질내, 직장 또는 설하 투여 경로에 의해 투여할 수 있고, 각 투여 경로에 대해 적당한 투여 형태로 제형화할 수 있다[참조: PCT 국제공개공보 WO 93/25221 및 WO 94/17784; 및 유럽 특허 출원 613,683].

CVSP14 폴리펩티드에 결합하는 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 CVSP14 폴리펩티드의 생물학적 역할을 이해하기 위한 독특한 도구로서 시험관내에서 유용한데, 이에는 CVSP14 폴리펩티드의 생성에 영향을 미치고, 이러한 생성에 의해 영향을 받는 것으로 여겨지는 많은 인자를 평가하는 것이 포함된다. 상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 또한, CVSP14 폴리펩티드의 활성을 조절하고 이와 결합하는 기타 화합물의 개발에 유용한데, 이는 상기 화합물이 이러한 개발을 촉진시키는 구조와 활성 간의 상관관계에 대한 중요한 정보를 제공해주기 때문이다.

상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 또한, 새로운 CVSP14 폴리펩티드 또는 CVSP14 폴리펩티드 효능제에 대해 스크리닝하기 위한 검정에서 경쟁적 결 합제로서 유용하다. 이러한 검정 양태에서는, 상기 화합물을 변형시키지 않고 사용할 수 있거나, 또는 각종 방식으로 변형시킬 수 있는데, 예를 들면, 잔기를 직접 또는 간접적으로 표지화, 예를 들면, 공유적 또는 비-공유적으로 연결시킴으로써, 검출 가능한 시그날을 제공한다. 이들 양태 모두에서는, 이에 대한 물질을 직접 또는 간접적으로 표지시킬 수 있다. 직접적인 표지화를 가능하게 해주는 것에는 표지 그룹, 예를 들면, 방사성표지, 예를 들면, ^{125}I 효소(미국 특허 제3,645,090호), 예를 들면, 퍼옥시다제 및 알칼린 포스파타제; 및 형광 강동, 파장 이동, 또는 형광 평광 상의 변화를 모니터할 수 있는 형광 표지(미국 특허 제3,940,475호)가 포함된다. 간접적인 표지화를 가능하게 해주는 것에는 하나의 구성원을 바이오티닐화한 다음, 상기 표지 그룹 중의 하나와 커플링된 아비딘과 결합시키는 것이 포함된다. 화합물을 고체 지지체에 부착시켜야 하는 경우에는, 상기 화합물이 스페이서 또는 링커를 포함할 수도 있다.

더우기, CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 이들의 능력에 근거하며, 상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 살아있는 세포, 고정 세포, 생물학적 유체, 지족 균질물 및 정제된 천연 생물학적 물질 중에서 CVSP14 폴리펩티드를 검출하기 위한 시약으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체를 표지화시킴으로써, CVSP14 폴리펩티드를 갖는 세포를 동정할 수 있다. 또한, CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 이들의 능력에 근거하여, 상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체를 동일계 염색, FACS(형광-활성화 세포 분류법), 웨스턴 블롯팅, ELISA 및 기타 분석 프로토콜에 사용할 수 있다. CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 이들의 능력에 근거하여, 상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 CVSP14 폴리펩티드(들)를 정제하거나 또는 CVSP14 폴리펩티드(들), 예를 들면, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인을 암호화하는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 정제하는데 사용할 수 있다.

상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 각종 의학적 연구 및 진단적 용도에 사용하기 위한 상업용 시약으로서 사용될 수도 있다. 펩티드 및 펩티드 모사체의 활성은 문헌[참조: McDonald (1992) Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology, 14:8-21]에 기재된 수 많은 모델 중의 하나에서 생체내 또는 시험관내에서 평가할 수 있다.

3. 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체 치료법

펩티드 동족체가, 주형 펩티드와 유사한 특성을 지닌 비-펩티드 약물로서 약제학적 산업 분야에 통상적으로 사용된다. 이들 유형의 비-펩티드 화합물이 '펩티드 모사체' 또는 '펩티도-모사체'로 지칭된다[참조: Luthman et al., A Textbook of Drug Design and Development, 14:386-406, 2nd Ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:1699-1720; Fauchere (1986) J. Adv. Drug Res., 15:29; Veber and Freidinger (1985) TINS, p. 392; and Evans et al. (1987) J. Med. Chem. 30:1229]. 치료학적으로 유용한 펩티드와 구조적으로 유사한 펩티드 모사체를 사용하여, 등가의 또는 증강된 치료학적 또는 예방학적 효과를 가져다 줄 수 있다. 펩티드-모사체의 제 조 및 이의 구조는 당업자에게 공지되어 있다.

컨센서스 서열의 하나 이상의 아미노산을 동일한 유형의 D-아미노산으로 체계적으로 치환시켜(예를 들면, L-리신을 D-리신으로 대체시킴), 보다 안정적인 펩티드를 생성시킬 수 있다. 또한, 컨센서스 서열 또는 실질적으로 동일한 컨센서스 서열 변형물을 함유하는 제한된 펩티드는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 생성시킬 수 있는데[참조: Rizo et al. (1992) An. Rev. Biochem., 61:387; 본원에 참조문헌으로써 삽입됨], 예를 들면, 해당 펩티드를 폐환시키는 분자내 디설파이드 브릿지를 형성할 수 있는 내부 시스테인 잔기를 부가함으로써 발생시킬 수 있다.

당업자는 해당 펩티드의 생물학적 또는 기능적 활성에 불리한 영향을 미치지 않으면서 상기 펩티드 및 펩티드 모사체

를 변형시킬 수 있다는 것을 인지하고 있다. 추가로, 당업자에게는 표적 분자, 예를 들면, CVSP14 폴리펩티드, 또는 일반적으로 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 결합하는 펩티드를 모사하는 비-펩티드 구조물을 3차원 형태로 고안하는 방법이 공지되어 있다[참조: Eck and Sprang (1989) J. Biol. Chem., 26: 17605-18795].

진단 목적으로 사용된 경우, 펩티드 및 펩티드 모사체는 검출 가능한 시그날로 표지시킬 수 있으므로, 이러한 표지를 갖지 않는 펩티드 및 펩티드 모사체는 표지된 펩티드 및 펩티드 모사체를 제조하는데 있어서 중간체로서 제공될 수 있다. 검출 가능한 표지는, 펩티드 및 펩티드 모사체에 공유적으로 부착되는 경우에, 이러한 펩티드 및 펩티드 모사체를 생체내에서, 예를 들면, 상기 펩티드 및 펩티드 모사체가 투여된 환자에게서 검출할 수 있게 해주거나, 또는 시험관내에서, 예를 들면, 샘플 또는 세포에서 검출할 수 있게 해주는 분자 또는 화합물일 수 있다. 적합한 검출 가능한 표지는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 이의 예를 들면, 방사성동위원소, 형광성 표지(예: 플루오레세인) 등이 있다. 이용된 특정한 검출 가능한 표지는 중요하지 않고, 이는 비-독성 수준에서 검출 가능하도록 선택된다. 상기 표지의 선택은 당해 분야에 널리 공지된 기술이다.

검출 가능한 표지를 펩티드 또는 펩티드 모사체에 공유적으로 부착시키는 것은 당해 분야에 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 수행된다. 예를 들어, ^{125}I 방사성 동위원소를 검출 가능한 표지로서 이용하는 경우, ^{125}I를 펩티드 또는 펩티드 모사체에 공유 부착시키는 것은 아미노산 티로신을 상기 펩티드 또는 펩티드 모사체 내로 혼입시킨 다음, 이러한 펩티드를 요오드화함으로써 달성될 수 있다[참조: Weaner et al. (1994) Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, pp. 137-140]. 티로신이 펩티드 또는 펩티드 모사체에 존재하지 않는 경우, 티로신을 상기 펩티드 또는 펩티드 모사체의 N 또는 C 말단에 혼입시키는 것은 널리 공지된 화학에 의해 달성될 수 있다. 마찬가지로, ^{32}P는, 통상적인 화학을 사용하여 펩티드 또는 펩티드 모사체 상의 하이드록실 그룹을 통하여 포스페이트 잔기로서 상기 펩티드 또는 펩티드 모사체 상으로 혼입시킬 수 있다.

펩티드 모사체를 표지화하는 것은 통상적으로, 하나 이상의 표지를 직접적으로 또는 스페이서(예: 아미드 그룹)를 통하여, 정량적 구조-활성 데이터 및/또는 분자 모델링에 의해 예상되는 펩티드 모사체 상의 비-간섭 위치(들)에 공유 부착시 키는 것을 포함한다. 이러한 비-간섭 위치는 일반적으로, 이에 펩티드 모사체가 결합하여 치료학적 효과를 가져다 주는 거대분자(들)와 직접적인 접촉물을 형성하지 않는 위치이다. 펩티드 모사체를 유도체화(예를 들면, 표지화)하는 것은 해당 펩티드 모사체의 목적하는 생물학적 또는 약리학적 활성을 실질적으로 방해하지 말아야 한다.

CVSP14 폴리펩티드 또는 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 결합할 수 있고/있거나 이의 활성을 조절해 주거나 CVSP14 폴리펩티드 활성을 나타낼 수 있는 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체가 신생물성 질병의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 치료를 필요로 하는 피검자의 세포에 생체내 또는 생체외적으로 전달될 수 있다. 추가로, CVSP14 폴리펩티드 활성을 지닌 펩티드는, CVSP14 폴리펩티드 유전자를 암호화하는 결여된 대립유전자 또는 돌연변이체를 갖는 세포에 생체내 또는 생체외적으로 전달될 수 있다. 본원에 기재되어 있거나 당업자에게 공지된 어떠한 기술도, 기타 사람 단백질을 실질적으로 갖고 있지 않는 상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체의 제조와 이의 생체내 또는 생체외 전달에 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체는 미생물에서 발현시키거나 시험관내에서 합성함으로써 용이하게 제조할 수 있다.

펩티드 또는 펩티드 모사체는, 예를 들어, 미세주사하거나 또는 리포좀을 사용함으로써, 세포 내로 생체내 또는 생체외적으로 도입할 수 있다. 또 다른 한편, 이러한 펩티드, 폴리펩티드 또는 펩티드 모사체는 세포에 의해 생체내 또는 생체 외, 능동적 또는 확산에 의해 흡수될 수 있다. 또한, 펩티드, 폴리펩티드 또는 펩티드 모사체를 세포외적으로 적용하는 것이 신생물성 질병을 치료하는데 충분할 수 있다. 1) CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인과 결합하거나, 또는 2) CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인과 유사한 기능 또는 활성을 지닌 기타 분자, 예를 들면, 약물 또는 유기 화합물이 치료 방법에 사용될 수 있다.

4. 합리적인 약물 고안

합리적인 약물 고안의 목표는, 예를 들어, 보다 활성이거나 안정적인 형태의 약물을 만들거나 또는 예를 들어, 생체내에서 폴리펩티드(예: CVSP14 폴리펩티드)의 기능을 증강 또는 방해하는 약물을 만들기 위해, 이들과 상호작용하는 펩티드 모사체 또는 작은 분자의 구조적 동족체, 또는 관심있는 생물학적 활성 폴리펩티드 또는 펩티드의 구조적 동족체를 생성시키는 것이다. 한 가지 접근법에서는, 먼저, 관심있는 단백질(예: CVSP14 폴리펩티드 또는 프로테아제 도메인을 갖는 폴리펩티드)의 3차원 구조, 또는 예를 들어, CVSP14 폴리펩티드-리간드 복합체의 3차원 구조를 X선 결정학, 컴퓨터 모델링 또는 가장 전형적으로는, 접근법들의 조합에 의해 결정한다[참조: Erickson et al. 1990]. 또한, 동종 단백질의 구조에 근거하여 모델링함으로써, 특정 폴리펩티드의 구조에 관한 유용한 정보를 획득할 수 있다. 또한, 알라닌 스캔으로 펩티드를 분석할 수 있다. 이러한 기술에서는, 아미노산 잔기를 Ala로 대체시키고, 펩티드의 활성에 대한 이의 효과를 결정한다. 상기 펩티드의 각각의 아미노산 잔기를 이러한 방식으로 분석하여 해당 펩티드의 중요한 영역을 결정한다.

또한, CVSP14 폴리펩티드, 또는 일반적으로, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 결합하는 폴리펩티드 또

는 펩티드는 기능적 검정에 의해 선별할 수 있으며, 이어서 이러한 폴리펩티드 또는 펩티드의 결정 구조를 결정할 수 있다. 상기 폴리펩티드는, 예를 들어, CVSP14 폴리펩티드 또는 CVSP14 폴리펩티드의 단백질 도메인에 특이적인 항체일 수 있다. 이러한 접근법으로, 후속 약물 고안의 근간이 되는 약물작용 발생단일 생성될 수 있다. 추가로, CVSP14 폴리펩티드 또는 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 결합하는 기능상의 약리학적 활성 폴리펩티드 또는 펩티드에 대한 항-유전인자성 폴리펩티드 또는 펩티드(anti-ids)를 생성시킴으로써 결정학을 함께 바이패스하는 것이 가능하다. 거울 영상물로서, anti-ids의 결합 부위를 최초 표적 분자, 예를 들면, CVSP14 폴리펩티드 또는 CVSP14 폴리펩티드를 갖는 폴리펩티드의 동족체에 노출시킨다. 이어서, 상기 항-id를 사용하여, 화학적 또는 생물학적으로 생성된 펩티드 뱅크로부터 펩티드를 동정 및 분리시킬 수 있다. 이어서, 이와 같이 선별된 펩티드가 약물작용 발생단으로서 작용할 것이다.

따라서, 예를 들어, 개선된 활성 또는 안정성을 지니거나 또는 CVSP14 폴리펩티드 활성의 조절제(예: 억제제, 효능제, 길항제)로서 작용하는 약물을 고안할 수 있으며, 이는 신생물성 질병의 진단, 치료, 예방 및 스크리닝 방법에 유용하다. 클론된 CVSP14 폴리펩티드 서열을 이용할 수 있기 때문에, X선 결정학과 같은 분석 연구를 수행하는데 충분한 양의 CVSP14 폴리펩티드(들)를 이용 가능한 수준으로 만들 수 있다. 또한, CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인, 예를 들면, 서열 5 및 6의 아미노산 서열에 의해 암호화된 프로테아제 도메인의 아미노산 서열에 관한 지식이 X선 결정학 대신 또는 이에 덧붙여서, 컴퓨터 모델링 기술에 대한 지침을 제공해줄 수 있다.

CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 펩티드 및 펩티드 모사체를 동정하는 방법

본원에 제공된 CVSP14 폴리펩티드(들)(예를 들면, CVSP14 폴리펩티드 또는 CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인을 갖는 폴리펩티드)와 결합 친화성을 지닌 펩티드는, 예를 들어, 친화성 증강 과정과 연계된 무작위 펩티드 다양성 발생 시스템에 의해 용이하게 동정할 수 있다. 구체적으로 언급하면, 무작위 펩티드 다양성 발생 시스템에는 '플라스미드 상의 펩티드' 시스템[참조: 미국 특허 제5,270,170호 및 제5,338,665호]; '파아지 상의 펩티드' 시스템[참조: 미국 특허 제6,121,238호 및 Cwirla,et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:6378-6382]; '폴리솜 시스템'; '암호화된 합성 라이브러리(ESL)' 시스템; 및 '극히 대용량의 고정화된 중합체 합성' 시스템[참조: U.S. Patent No. 6,121,238; and Dower et al. (1991) An. Rep. Med. Chem. 26:271-280]이 포함된다.

예를 들면, 상기 언급된 과정을 사용하여, 규정된 수의 아미노산 잔기 길이(예: 12개)를 갖는 무작위 펩티드를 일반적으로 고안할 수 있다. 이러한 무작위 펩티드를 암호화하는 올리고뉴클레오티드의 집합물을 생성하기 위해, 코돈 모티프 $(NNK)_x$ [여기서, N은 뉴클레오티드 A, C, G 또는 T(등몰; 이용된 방법에 따라서, 기타 뉴클레오티드가 이용될 수 있다)이고, K는 G 또는 T(등몰)이며, x는 펩티드 내 의 아미노산 수에 상응하는 정수(예: 12)이다]를 사용하여, 상기 NNK 모티프로부터 발생된 32개의 가능한 코돈 중의 어느 하나를 구체화할 수 있다: 12개 아미노산 각각에 대해 1개, 5개 아미노산 각각에 대해 2개, 3개의 아미노산 각각에 대해 3개, 및 3개의 중지 코돈 중의 단지 1개. 따라서, 상기 NNK 모티프는 아미노산 모두를 암호화하고, 단지 1개의 중지 코돈만을 암호화하며, 코돈 바이어스를 감소시킨다.

무작위 펩티드는 예를 들어, 파아지 입자의 표면 상에, 파아지 fd 유도체의 pIII 또는 pVIII 코트 단백질을 함유하는 융합 단백질의 일부로서(파아지 상의 펩티드), 또는 플라스미드에 결합된 LacI 펩티드 융합 단백질을 갖는 융합 단백질로서(플라스미드 상의 펩티드) 존재할 수 있다. 해당 펩티드를 암호화하는 DNA를 포함한, 상기 파아지 또는 플라스미드는 프로테아제 도메인을 갖는 고정화된 CVSP14 폴리펩티드(들)를 사용하는 친화성 증강 과정에 의해 동정 및 분리할 수 있다. 종종 '패닝(panning)'으로 지칭되기도 하는 친화성 증강 과정은 전형적으로, 상기 파아지, 플라스미드 또는 폴리솜을 상기 고정화된 CVSP14 폴리펩티드(들)과 함께 다수회 동안 항온처리하고; CVSP14 폴리펩티드(들)와 결합하는 파아지, 플라스미드 또는 폴리솜을 (이에 수반되는 DNA 또는 mRNA와 함께) 수집하며; 수집된 더 많은 양의 파아지 또는 플라스미드를 (이에 수반되는 LacI-펩티드 융합 단백질과 함께) 생성시키는 것을 포함한다.

펩티드 및 펩티드 모사체의 특징

치료학적 적용을 위한 펩티드, 폴리펩티드 및 펩티드 모사체로는 분자량이 약 250 내지 약 8,000달톤인 것이 있다. 이러한 펩티드를 (예를 들어, 해당 화합 물의 친화성 및/또는 활성을 증가시키기 위해) 친수성 중합체와 올리고머화, 이량체화 및/또는 유도체화한 경우에는, 상기 펩티드의 분자량이 실질적으로 더 클 수 있고, 약 500 내지 약 120,000달톤, 일반적으로 약 8,000 내지 약 80,000달톤 범위일 수 있다. 상기 펩티드는 천연 또는 합성(비-천연) 아미노산을 9개 이상 함유할 수 있다. 당업자는 치료 및/또는 진단 목적에 적합한 펩티드 및 펩티드 모사체의 친화도와 분자량을 결정할 수 있다[참조: Dower et al., 미국 특허 제6,121,238호].

상기 펩티드는 각종 친수성 중합체 중의 하나 이상에 공유적으로 부착시킬 수 있다. 적합한 친수성 중합체에는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜로써 예시된 폴리알킬에테르, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리옥시알켄, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈 및 셀룰로즈 유도체, 덱스트란 및 덱스트란 유도체가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 펩티드 화합물을 상기 중합체로 유도체화시킨 경우에, 이의 용해도 및 순환 반감기는 거의 증가되지 않을 수 있으며, 경우에 따라, 이들의 결합 활성을 저하시킬 수 있다. 펩티드 화합물을 이량체화할 수 있고, 이러한 이량

체성 소단위체 각각을 친수성 중합체에 공유적으로 부착시킬 수 있다. 펩티드 화합물을 PEG화시킬 수 있는데, 즉 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 공유적으로 부착시킬 수 있다.

5. 펩티드 및 펩티드 모사체의 제조 방법

CVSP14 폴리펩티드와 결합하는 펩티드는 당해 분야에 공지된 전통적인 방법, 예를 들면, 표준 고체 상 기술을 사용함으로써 제조할 수 있다. 표준 방법에는 배 제 고체 상 합성, 부분 고체 상 합성 방법, 단편 축합, 전통적인 용액 합성, 및 심지어 재조합 DNA 기술이 포함된다[참조: Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149, 본원에 참조문헌으로써 삽입됨].

'암호화된 합성 라이브러리' 또는 '극히 대용량의 고정화 중합체 합성' 시스템[참조: 미국 특허 제5,925,525호 및 제5,902,723호]을 사용하여, 관심있는 활성을 지닌 펩티드의 최소 크기를 결정할 수 있다. 또한, 1개, 2개 이상의 잔기에 목적하는 모티프(또는 이러한 모티프의 최소 크기)와 상이한 펩티드 그룹을 형성하는 모든 펩티드를 제조할 수 있다. 이어서, 이러한 펩티드 집합물을 대상으로 하여, 표적 분자, 예를 들면, CVSP14 폴리펩티드 또는 일반적으로, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인과 결합하는 능력에 대해 스크리닝할 수 있다. 상기 고정화 중합체 합성 시스템 또는 기타 펩티드 합성 방법을 또한 사용하여, 상기 펩티드 화합물의 절단 동족체 및 결실 동족체, 및 이의 절단 및 결실 동족체의 조합물을 합성할 수 있다.

이들 과정을 사용하여, 20개의 천연 아미노산 이외의 아미노산, 유전적으로 암호화된 아미노산가 펩티드의 1개, 2개 또는 그 이상의 위치에서 치환된 펩티드를 합성할 수도 있다. 예를 들면, 트립토판을 나프틸알라닌으로 치환시켜 합성을 촉진시킬 수 있다. 펩티드 내로 치환될 수 있는 기타 합성 아미노산에는 L-하이드록시프로필, L-3,4-디하이드록시-페닐알라닐, d-아미노산, 예를 들면, L-d-하이드록실리실 및 D-d-메틸알라닐, L-α-메틸알라닐, β-아미노산, 및 이소퀴놀릴이 포함된다. D 아미노산 및 비-천연 합성 아미노산을 펩티드 내로 혼입시킬 수도 있다[참조: Roberts et al. (1983) Unusual Amino/Acids in Peptide Synthesis, 5(6):341-449].

펩티드는 또한, 인산화[참조: W. Bannwarth et al. (1996) Biorganic and Medicinal Chemistry Letters, 6(17):2141-2146], 및 펩티드 유도체를 제조하는 기타 방법[참조: Hruby et al. (1990) Biochem. J., 268(2):249-262]에 의해 변형시킬 수 있다. 따라서, 펩티드 화합물은 유사한 생물학적 활성을 나타내는 펩티드 모사체를 제조하기 위한 기준물로서 제공되기도 한다. 당업자는 상응하는 펩티드 화합물과 동일하거나 유사한 목적하는 생물학적 활성을 지니고 있지만, 용해도, 안정성 및 가수분해 민감성 및 단백질분해 측면에서 상기 펩티드 보다 더 바람직한 활성을 나타내는 펩티드 모사체를 작제하는데 각종 기술이 이용될 수 있다는 것을 인식하고 있다[참조: Morgan et al. (1989) An. Rep. Med. Chem., 24:243-252]. N-말단 아미노 그룹 또는 C-말단 카복실 그룹에서 변형된 펩티드 모사체를 제조하는 방법, 및/또는 펩티드 내의 하나 이상의 아미드 연결을 비-아미드 연결로 변화시키는 방법이 당업자에게 공지되어 있다.

아미노 말단 변형에는 알킬화, 아세틸화 및 카보벤조일 그룹 부가, 석신이미드 그룹 형성 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다[참조: Murray et al. (1995) Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed., John Wiley and Sons, Inc.]. C-말단 변형물에는 C-말단 카복실 그룹을 에스테르, 아미드로 대체시킨 모사체, 또는 사이클릭 펩티드를 형성시키는 변형물이 포함된다.

N-말단 및 C-말단 변형 이외에도, 펩티드 모사체를 포함한 펩티드 화합물은 하나 이상의 각종 친수성 중합체를 이용하여 변형시키거나 또는 이와 공유적으로 커플링시키는 것이 유리할 수 있다. 펩티드 화합물을 친수성 중합체로 유도체화한 경우에, 이의 용해도 및 순환 반감기가 증가될 수 있고 이의 면역원성이 거의 은폐되지 않았으며, 경우에 따라 이의 결합 활성이 저하된 것으로 밝혀졌다. 적합한 비-단백질성 중합체에는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜로써 예시된 폴리알킬에테르, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리옥시알켄, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈 및 셀룰로즈 유도체, 덱스트란 및 덱스트란 유도체가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 이러한 친수성 중합체는 평균 분자량이 약 500 내지 약 100,000달톤인데, 이에는 약 2,000 내지 약 40,000달톤, 및 약 5,000 내지 약 20,000달톤이 포함된다. 친수성 중합체는 또한, 평균 분자량이 약 5,000달톤, 10,000달톤 및 20,000달톤일 수 있다.

펩티드 화합물을 유도체화하는 방법, 또는 펩티드를 상기 중합체에 커플링하는 방법이 다음 문헌에 보고되었다[참조: Zallipsky (1995) Bioconjugate Chem., 6:150-165; Monfardini et al. (1995) Bioconjugate Chem., 6:62-69; 미국 특허 제 4,640,835호; 미국 특허 제4,496,689호; 미국 특허 제4,301,144호; 미국 특허 제 4,670,417호; 미국 특허 제4,791,192호; 미국 특허 제4,179,337호 및 WO 95/34326, 이들 모두의 전문이 본원에 참조문헌으로써 삽입되어 있다].

펩티드 유도체를 제조하는 다른 방법은, 예를 들면, 본원에 참조문헌으로써 삽입된 문헌[참조: Hruby et al. (1990), Biochem J., 268(2):249-262]에 기재되어 있다. 따라서, 펩티드 화합물은 유사한 생물학적 활성을 지닌 비-펩티드

성 화합물에 대한 구조적 모델로서 제공된다. 당업자는 특정한 펩티드 화합물과 동일하거나 유사한 목적하는 생물학적 활성을 지니고 있지만, 용해도, 안정성 및 가수분해 민감성 및 단백질분해 측면에서 더 바람직한 활성을 나타내는 화합물을 작제하는데 각종 기술이 이용될 수 있다는 것을 인식하고 있다[참조: Morgan et al. (1989) An. Rep. Med. Chem., 24:243-252, 이는 본원에 참조문헌으로써 삽입됨]. 이들 기술에는 펩티드 주쇄를, 포스포네이트, 아미데이트, 카바메이트, 설폰아미드, 2급 아민 및 N-메틸아미노산으로 구성된 주쇄로 대체시킨 기술이 포함된다.

펩티드 화합물은 시스테인의 티올 그룹 간에 분자내 디설파이드 결합을 갖는 폐환된 형태로 존재할 수 있다. 또 다른 한편, 시스테인의 티올 그룹 간의 분자간 디설파이드 결합이 생성되어 이량체성(또는 보다 고차수의 올리고머성) 화합물을 생성시킬 수 있다. 하나 이상의 시스테인 잔기를 호모시스테인으로 치환시킬 수 있다.

I. 접합체

a) CVSP14 폴리펩티드의 일본쇄 프로테아제 도메인(또는 이의 단백질분해적 활성 부분), 또는 이의 완전한 길이의 지모겐, 활성화 형태, 또는 이본쇄 또는 일본쇄 프로테아제 도메인; 및 b) CVSP14 폴리펩티드에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된, i) 접합체의 친화적 분리 또는 정제; ii) 특정 표면에 대한 접합체의 부착; iii) 접합체의 검출의 촉진; 또는 iv) 선택된 조직 또는 세포로의 표적화된 전달을 촉진시키는 표적화제를 함유하는 접합체가 본원에 제공된다. 이러한 접합 체는 화학적 접합체 또는 이의 융합 단백질 혼합물일 수 있다.

표적화제는 직접적으로 또는 링커를 통하여 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인에 연결된 단백질 또는 단백질 단편, 예를 들면, 조직 특이적 또는 종양 특이적 모노클로날 항체 또는 성장 인자 또는 이의 단편일 수 있다. 표적화제는 또한, 단백질 결합 서열, 핵산 결합 서열, 지질 결합 서열, 폴리사카라이드 결합 서열, 또는 금속 결합 서열, 또는 고체 지지체에 부착하기 위한 링커를 함유하는 단백질 또는 펩티드 단편일 수 있다. 특정 양태에서, 상기 접합체는 a) 본원에 기재된 바와 같은, CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 일부분; 및 b) 이러한 CVSP14 폴리펩티드에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된 표적화제를 함유한다.

CVSP14 폴리펩티드와, 예를 들어, CVSP14 폴리펩티드 도메인의 친화적 분리 또는 정제, 특정 표면에 대한 CVSP14 폴리펩티드의 부착, 또는 CVSP14 폴리펩티드 도메인의 검출을 촉진시키는 기능을 하는 단일(또는 다수의) 단백질 또는 펩티드 단편과의 접합체, 예를 들면, 융합 단백질 및 화학적 접합체가 제공된다. 이러한 접합체는 화학적 접합, 예를 들면, 티올 결합을 통하여 제조할 수 있고, 융합 단백질로서의 재조합 수단에 의해 제조할 수 있다. 융합 단백질에서는, 상기 펩티드 또는 이의 단편을 CVSP14 폴리펩티드 도메인의 N-말단 또는 C-말단에 연결시킨다. 화학적 접합체에서는, 상기 펩티드 또는 이의 단편을, 접합이 수행될 수 있는 어느 곳에도 연결할 수 있으며, 단일 또는 다수의 CVSP14 폴리펩티드 도메인에 다수의 상기 펩티드 또는 이의 펩티드가 연결될 수 있다.

표적화제는 특정 세포 또는 조직으로 시험관내 또는 생체내 전달하기 위한 것이며, 이에는 특이적 세포 상에 발현된 잔기와 결합하는 제제, 예를 들면, 세포 또는 조직-특이적 항체, 성장 인자 및 기타 인자; 및 연결된 단백질의 직접적인 전달을 증진시키는 기타 세포 또는 조직 특이적 제제가 포함된다. 이러한 표적화제는 세포 표면 단백질과의 상호작용 및 접합체 또는 이의 CVSP14 폴리펩티드 부분의 내재화에 의해 CVSP14 폴리펩티드를 선택된 세포 내로 특이적으로 전달시키는 것일 수 있다.

이들 접합체는 각종 방법에 사용되고, 프로드럭, 예를 들면, 표적화된 세포 또는 조직에 위치하거나 이 근처에 위치하는 특정한 CVSP14에 의해 절단시, 단백질이 세포독성인 프로드럭을 활성화시키는 방법에 사용하는데 특히 적합하다. 이러한 프로드럭은 접합체의 투여 이전, 동시에 또는 투여 후에 투여한다. 표적화된 세포로의 전달시, 프로테아제는 프로드럭을 활성화시켜 치료학적 효과(예: 세포독성 효과)를 나타낸다.

1. 접합

연결된 CVSP14 폴리펩티드와의 접합체는 화학적 접합, 재조합 DNA 기술, 또는 재조합 발현과 화학적 접합의 조합에 의해 제조할 수 있다. CVSP14 폴리펩티드 도메인과 표적화제는 어떠한 배향으로도 연결할 수 있고, 하나 이상의 표적화제 및/또는 CVSP14 폴리펩티드 도메인이 접합체에 존재할 수 있다.

a. 융합 단백질

융합 단백질이 본원에 제공된다. 융합 단백질은 a) 1개 또는 다수의 CVSP14 폴리펩티드 도메인; 및 b) 표적화제를 함유한다. 융합 단백질은 일반적으로, 이러 한 융합 단백질을 암호화하는 핵산을 재조합 발현시킴으로써 생성된다.

b. 화학적 접합

본원에서 화학적 접합을 수행하기 위해, CVSP14 폴리펩티드 도메인을 하나 이상의 선택된 링커를 통하여 또는 직접

적으로 표적화제에 연결시킨다. 표적화제가 펩티드 또는 단백질 이외의 것, 예를 들면, 핵산 또는 비-펩티드 약물인 경우에는, 화학적 접합을 사용해야만 한다. 선택된 잔기를 화학적 접합시키는 것으로 당업자에게 공지된 모든 수단을 사용할 수 있다.

2. 링커

2가지 목적용 링커가 본원에 제공된다. 접합체는 CVSP14 폴리펩티드 부분과 표적화제 간에 하나 이상의 링커를 포함할 수 있다. 부가적으로, 링커는 고 처리량 고체 상 스크리닝 프로토콜에 대해서와 같이, CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 일부분을 고체 지지체, 예를 들면, 미세역가 플레이트, 규소 또는 규소-피복된 칩, 유리 또는 플라스틱 지지체 상에 고정화시키는 것을 촉진 또는 증강시키는데 사용된다.

접합체를 제조하는 것으로 당업자에게 공지된 모든 링커가 본원에 사용될 수 있다. 이들 링커는 전형적으로, 화학적 접합체를 제조하는데 사용되며; 펩티드 링커가 융합 단백질 내로 혼입될 수 있다.

링커는 CVSP14 폴리펩티드와 표적화제를 연합시키는데 적합한 임의의 잔기일 수도 있다. 이러한 링커 및 결합에는 전형적으로 1 내지 약 60개의 아미노산, 보다 일반적으로 약 10 내지 30개의 아미노산을 함유하는 아미노산 및 펩티드 결합, 펩티드성 결합; 화학적 링커, 예를 들면, 헤테로-이작용성 절단 가능한 교차-링커가 포함되지만, 이에 제한되지 않고, 상기 화학적 링커에는 N-석신이미딜 (4-요오도아세틸)-아미노벤조에이트, 설포석신이미딜 (4-요오도아세틸)-아미노벤조에이트, 4-석신이미딜-옥시카보닐-a-(2-피리딜디티오)톨루엔, 설포석신이미딜-6-[a-메틸-a-(피리딜디티올)-톨루아미도] 헥사노에이트, N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)-프로피오네이트, 석신이미딜 6[3-(2-피리딜디티오)-프로피온아미도] 헥사노에이트, 3-(2-피리딜디티오)-프로피오닐 하이드라지드, 엘만 시약, 디클로로트리아진산, 및 S-(2-티오피리딜)-L-시스테인이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 기타 링커에는 CVSP14 폴리펩티드 도메인과 표적화제 간의 입체 장애를 감소시키는 펩티드 및 기타 잔기; 세포내 효소 기질; 접합체의 가요성을 증가시키는 링커, 접합체의 용해도를 증가시키는 링커, 접합체의 혈청 안정성을 증가시키는 링커, 광 절단가능한 링커 및 산 절단가능한 링커가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

화학적으로 연결된 접합체에 적합한 링커 및 결합의 기타 예에는 디설파이드 결합, 티오에테르 결합, 방해된 디설파이드 결합, 및 유리 반응성 그룹(예: 아민 및 티올 그룹) 간의 공유 결합이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이들 결합은 헤테로-이작용성 시약을 사용하여 해당 폴리펩티드 중의 하나 또는 둘 다 상에 반응성 티올 그룹을 생성시킨 다음, 하나의 폴리펩티드 상의 티올 그룹을 반응성 티올 그룹 또는 아미드 그룹과 반응시켜, 반응성 말레이미드 그룹 또는 티올 그룹이 다른 것에 부착될 수 있도록 함으로써 제조한다. 기타 링커에는 보다 산성인 세포내 구획에서 절단될 수 있는 산 절단가능한 링커, 예를 들면, 비스말레이미드에톡 시 프로판, 산 불안정한-트랜스페린 접합체 및 아디프산 디하이드라지드; 자외선 또는 가시광선에 대한 노출시 절단되는 교차 링커; 및 사람 IgG_1의 불변 영역으로부터의 링커, 예를 들면, 가변 영역(예: C_H1, C_H2 및 C_H3)이 포함된다[참조: Batra et al. Molecular Immunol., 30:379-386 (1993)]. 몇몇 양태에서는, 각 링커의 목적하는 특성의 이점을 취하기 위해 몇 가지 링커가 포함될 수 있다.

화학적 링커 및 펩티드 링커는, 이들 링커를 CVSP14 폴리펩티드 도메인 및 표적화제와 공유적으로 커플링시킴으로써 삽입시킬 수 있다. 다음에 기재된 헤테로-이작용성 제제를 사용하여, 이러한 공유 커플링을 수행할 수 있다. 펩티드 링커는 또한, 융합 단백질로서 링커와 치료제(TA), 링커와 표적화제, 또는 링커, 표적화제 및 치료제(TA)를 암호화하는 DNA를 발현함으로써 연결시킬 수 있다. 가요성 링커, 및 접합체의 용해도를 증가시키는 링커가 단독으로 사용되거나 또는 기타 링커와 함께 사용되는 것이 본원에 또한 고려된다.

a) 산 절단가능한, 광 절단가능한 및 열 민감성 링커

산 절단가능한, 광 절단가능한 및 열 민감성 링커는, 특히 이들이 CVSP14 폴리펩티드 도메인을 절단함으로써 이것이 보다 용이하게 반응될 수 있도록 하는데 필요한 경우에 사용될 수도 있다. 산 절단가능한 링커에는 비스말레이미드에톡시 프로판; 및 아디프산 디하이드라지드 링커[참조: Fattom et al. (1992) Infection amp; Immun. 60:584-589] 및 세포내 트랜스페린 순환성 경로 내로의 유입을 허용하기에 충분한 트랜스페린 부분을 함유하는 산 불안정한 트랜스페린 접합체[참조: Welhoer et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:4309-4314]가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

광 절단가능한 링커는 빛에 대한 노출시 절단됨으로써[참조: Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-107; 이는 본원에 참조문헌으로써 삽입된다], 빛에 대한 노출시 표적화제를 방출시키는 링커이다. 빛에 대한 노출시 절단됨으로써, 빛에 대한 노출시 표적화제를 방출시키는 광 절단가능한 링커는 공지되어 있다[참조: 문헌(Hazum et al. (1981) in Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110)에는 시스테인에 대한 광 절단가능한 보호 그룹으로서 니트로벤질 그룹의 용도가 기재되어 있고; 문헌(Yen et al. (1989) Makromol. Chem 190:69-82)에는 하이드록시프로필메타크릴아미드 공중합체, 글리신 공중합체, 플루오레세인 공중합체 및 메틸로다민 공중합체를 포함한 수용성 광 절단가능한 공중합체가 기재되어 있으며; 문헌(Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-107)에는 자외선 근처의 빛(350nm)에 대한 노출시 광분해를 진행하는 가교결합제 및 시약이 기재되어 있고; 문헌

(Senter et al. (1985) Photochem. Photobiol 42:231-237)에는 광 절단가능한 결합을 생성시키는 니트로벤질옥시카보닐 클로라이드 가교결합 시약이 기재되어 있다]. 이러한 링커는 섬유 광학을 사용하여 빛에 대해 노출될 수 있는 피부 또는 안과 질환을 치료하는데 특정하게 사용될 수 있을 것이다. 접합체를 투여한 후, 눈 또는 피부 또는 기타 신체 일부를 빛에 노출시키면, 표적화된 잔기가 해당 접합체로부터 방출될 수 있다. 이러한 광 절단가능한 링커는, 표적화제를 동물 체내로부터 신속하게 제거할 수 있도록 하는 것이 요망되 는 진단 프로토콜과 연계해서 유용하다.

b) 화학적 접합용 기타 링커

기타 링커에는 각종 산도 또는 알칼리도에서 치료제를 방출시키는 접합체 종류를 생성시키는 트리틸 링커, 특히 유도체화 트리틸 그룹이 포함된다. 따라서, 치료제를 방출시키는 pH 범위를 예비선택하는 능력에 의해 부여된 가요성으로 인해, 치료제의 전달을 필요로 하는 조직들 간의 공지된 생리적 차이에 기준하여 링커를 선별할 수 있다[참조: 미국 특허 제5,612,474호]. 예를 들면, 종양 조직의 산도는 정상 조직의 산도 보다 더 낮은 것으로 여겨진다.

c) 펩티드 링커

링커 잔기는 펩티드일 수 있다. 펩티드 링커는 융합 단백질 및 화학적으로 연결된 접합체에 이용될 수 있다. 이러한 펩티드는 전형적으로 약 2 내지 약 60개의 아미노산 잔기, 예를 들면, 약 5 내지 약 40개, 또는 약 10 내지 약 30개의 아미노산 잔기를 갖는다. 선택된 길이는 링커가 포함되는 용도와 같은 요인에 좌우된다.

펩티드 링커는 표적화제가 단백질성인 경우에 유리하다. 예를 들어, 링커 잔기는 예를 들면, 일본쇄 항체 연구에서 공지된 바와 같은 가요성 스페이서 아미노산 서열일 수 있다. 이러한 공지된 링커 잔기의 예에는 펩티드, 예를 들면, $(Gly_m Ser)_n$ 및 $(Ser_m Gly)_n$ [여기서, n은 1 내지 6이고, 이에는 1 내지 4 및 2 내지 4가 포함되며, m은 1 내지 6이고, 이에는 1 내지 4 및 2 내지 4가 포함된다], 효소 절단 가능한 링커 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

부가의 연결 잔기가 예를 들어, 다음 문헌에 기재되어 있다[참조: Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, 1988; Whitlow, M., et al., Protein Engineering 6:989-995, 1993; Newton et al., Biochemistry 35:545-553, 1996; A. J. Cumber et al., Bioconj. Chem. 3:397-401, 1992; Ladurner et al., J. Mol. Biol. 273:330-337, 1997; 및 미국 특허 제4,894,443호]. 몇몇 양태에서는, 각 링커의 목적하는 특성의 이점을 취하기 위해 몇 가지 링커가 포함될 수 있다.

3. 표적화제

접합체의 검출, 고정화, 또는 정제를 촉진시키는 모든 제제가 본원에 사용된다. 화학적 접합체의 경우에는, 이러한 특성을 지닌 모든 잔기가 고려되고; 융합 단백질의 경우에, 표적화제는 표적화 활성을 나타내기에 충분한 단백질, 펩티드 또는 이의 단편이다. 고려된 표적화제에는 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 일부분을 선택된 세포 및 조직으로 전달해주는 것이 포함된다. 이러한 제제에는 종양 특이적 모노클로날 항체 및 이의 일부분, 성장 인자, 예를 들면, FGF, EGF, PDGF, VEGF, 사이토킨(케모카인 포함), 및 기타 제제가 포함된다.

4. 핵산, 플라스미드 및 세포

융합 단백질을 암호화하는 분리된 핵산 단편이 제공된다. 융합 단백질을 암호화하는 핵산 단편은 a) CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인을 암호화하는 핵산; 및 b) i) 융합 단백질의 친화적 분리 또는 정제, ii) 특정 표면에 대한 융합 단백질의 부착, 또는 iii) 융합 단백질의 검출을 촉진시키는 단백질, 펩티드 또는 이의 유효 단편을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일반적으로, 상기 핵산은 DNA이다.

상기 핵산 단편을 함유하는 복제용 플라스미드 및 발현용 벡터가 또한 제공된다. 이러한 플라스미드 및 벡터를 함유하는 세포가 또한 제공된다. 상기 세포는 세균 세포, 효모 세포, 진균 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 동물 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 적합한 모든 숙주일 수 있다. 핵산, 플라스미드, 및 이러한 플라스미드를 함유하는 세포는 본원에 기재된 것을 포함하여 당해 분야에 공지된 방법에 따라서 제조할 수 있다.

또한, 상기 융합 단백질의 제조 방법이 제공된다. 이의 예시적 방법은 융합 단백질이 해당 세포에 의해 발현되도록 하는 조건하에, 융합 단백질을 암호화하는 플라스미드를 함유하는 세포가 증식되도록 이를 성장, 즉 배양하는 단계; 및 발현된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함한다. 재조합 단백질을 발현 및 회수하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있고[참조: Current Protocols in Molecular Biology (1998) §16, John Wiley amp; Sons, Inc.], 이러한 방법은 발현된 융합 단백질을 발현 및 회수하는데 사용될 수 있다.

회수된 융합 단백질은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면, 원심분리, 여과, 크로마토그래피, 전기영동, 면역침전 등에 의해, 또는 이들을 조합함으로써 분리 또는 정제할 수 있다[참조: Current Protocols in Molecular Biology (1998

) §10, John Wiley amp; Sons, Inc.]. 일반적으로, 상기 회수된 융합 단백질은, 이러 한 융합 단백질의 단백질 또는 펩티드 단편과 친화적 결합 잔기와의 친화적 결합을 통하여 분리 또는 정제시킨다. 융합 단백질의 작제에 관한 상기 섹션에서 논의된 바와 같이, 모든 친화적 결합 쌍을 작제할 수 있고, 이를 해당 융합 단백질의 분리 또는 정제에 사용할 수 있다. 예를 들어, 친화적 결합 쌍은 단백질 결합 서열/단백질, DNA 결합 서열/DNA 서열, RNA 결합 서열/RNA 서열, 지질 결합 서열/지질, 폴리사카라이드 결합 서열/폴리사카라이드, 또는 금속 결합 서열/금속일 수 있다.

5. 고정화, 및 이에 대한 지지체 또는 기질

표적화제가 표면에 대한 연결을 위해 고안된 특정 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드를 이온성 또는 공유, 비-공유 또는 기타 화학적 상호작용과 같은 연결에 의해, 특정 지지체 또는 매트릭스 물질의 표면에 부착시킬 수 있다. 고정화는 직접 수행하거나 링커를 통하여 수행할 수 있다. CVSP14 폴리펩티드는 실리콘 칩, 및 본원에 기재되고 당업자에게 공지된 기타 지지체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 적합한 모든 지지체 상에 고정화시킬 수 있다. 다수의 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인을 지지체에 부착시킬 수 있는데, 예를 들면, 고 처리량 프로토콜 및 포맷에 사용하기 위해 규소 칩 또는 기타 칩의 표면 상에 접합체의 어레이(즉, 두 가지 이상의 패턴)를 형성할 수 있다.

또한, CVSP14 폴리펩티드 도메인을 이에 표적화제를 연결시키지 않고 표면에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결시킬 수 있는 것으로 인지된다. 따라서, 칩은 CVSP14 폴리펩티드 도메인의 어레이를 함유한다.

본원에서 고려된 매트릭스 물질 또는 고체 지지체는 일반적으로, 리간드 및 기타 분자를 고정화시키는 것으로 당업자에게 공지된 모든 불용성 물질이며, 이는 많은 화학적 합성 및 분리에 사용된다. 이러한 지지체는, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피, 생물학적 활성 물질의 고정화, 및 생체분자(단백질, 아미노산 및 기타 유기 분자 및 중합체 포함)의 화학적 합성 동안에 사용된다. 지지체의 제조와 용도는 당업자에게 널리 공지되어 있고; 많은 물질 및 이의 제조 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 천연 지지체 물질, 예를 들면, 아가로즈 및 셀룰로즈는 이들의 각각의 공급원으로부터 분리할 수 있고, 공지된 프로토콜에 따라서 처리할 수 있으며, 합성 물질은 공지된 프로토콜에 따라서 제조할 수 있다.

지지체는 전형적으로, 고체, 다공성 변형성 또는 경질인 불용성 물질이고, 요구되는 어떠한 구조 및 기하도 지니고 있는데, 이에는 비드, 펠릿, 디스크, 모세관, 동공 섬유, 니들, 고형 섬유, 무작위 외형물, 박막 및 막이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 상기 항목은 매트릭스 물질로부터 제작할 수 있거나, 또는 상기 표면의 전부 또는 일부를 피복시키건 입자를 합침시킴으로써 이와 조합할 수 있다.

전형적으로, 매트릭스가 미립자인 경우, 상기 입자는 약 10-2000㎛ 이상이지만, 선택된 적용에 따라서 보다 더 크거나 작을 수 있다. 매트릭스의 선택은 적어도 부분적으로는, 이들의 물리적 및 화학적 특성, 예를 들면, 용해도, 작용성 그룹, 기계적 안정성, 표면적 팽윤 경향, 소수성 또는 친수성 특성 및 의도된 용도에 의해 좌우된다.

필요한 경우, 지지체 매트릭스 물질은 적당한 반응성 잔기를 함유하도록 처 리할 수 있다. 몇몇 경우에는, 반응성 잔기를 미리 함유하고 있는 지지체 매트릭스 물질을 상업적으로 수득할 수 있다. 지지체 매트릭스 물질이 반응성 잔기를 함유함으로써, 이는 분자가 연결될 때 지지체 매트릭스로서 제공될 수 있다. 반응성 표면 잔기, 예를 들면, 아미노 실란 결합, 하이드록실 결합 또는 카복시실란 결합을 함유하는 물질은, 실란화 반응 등을 포함하는 널리 확립된 표면 화학 기술에 의해 제조할 수 있다. 이들 물질의 예는 감마-아미노-프로필실란에 공유적으로 연결된 표면 산화규소 잔기, 및 다음의 기타 유기 잔기를 갖는 것이다: N-[3-(트리에틸옥시실릴)프로필]프텔람산; 및 비스-(2-하이드록시에틸)아미노프로필트리에톡시실란. 아미노 그룹 반응성 작용기를 함유하는 용이하게 입수 가능한 물질의 예에는 파라-아미노페닐트리에톡시실란이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 유도체화 폴리스티렌 및 기타 중합체가 널리 공지되어 있고, 이는 당업자에게 용이하게 입수 가능하다[예를 들어, Tentagel 수지는 작용성 그룹의 크기에 따라 입수 가능하고, 공급원(Rapp Polymer, Tubingen, Germany)으로부터 시판된다; 문헌(미국 특허 제4,908,405호 및 미국 특허 제5,292,814호; 또한 Butz et al., Peptide Res., 7:20-23 (1994); and Kleine et al., Immunobiol., 190:53-66 (1994) 참조].

이들 매트릭스 물질에는 관심있는 분자를 부착시키기 위한 지지체 매트릭스로서 작용할 수 있는 모든 물질이 포함된다. 이러한 물질은 당업자에게 공지되어 있고, 이에는 지지체 매트릭스로서 사용된 것들이 포함된다. 이들 물질에는 무기물, 천연 중합체 및 합성 중합체가 포함되지만, 이에 제한되지 않고, 이들로는, 예 를 들어, 셀룰로즈, 셀룰로즈 유도체, 아크릴 수지, 유리, 실리카 겔, 폴리스티렌, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 비닐과 아크릴아미드의 공중합체, 디비닐벤젠 등과 가교결합된 폴리스티렌[참조: Merrifield, Biochemistry, 3:1385-1390 (1964)], 폴리아크릴아미드, 라텍스 겔, 폴리스티렌, 덱스트란, 폴리아크릴아미드, 고무, 실리콘, 플라스틱, 니트로셀룰로즈, 셀룰로즈, 천연 스폰지가 있다. 본원에서 특히 관심있는 것은 보로실리케이트, 알코올 및 물을 혼합함으로써 제조된 고도의 다공성 유리[미국 특허 제4,244,721호 참조] 등이다.

합성 지지체에는 다음이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다: 아크릴아미드, 덱스트란-유도체 및 덱스트란 공중합체, 아가로즈-폴리아크릴아미드 블렌드, 기타 중합체 및 각종 작용성 그룹과의 공중합체, 메타크릴레이트 유도체 및 공중

합체, 폴리스티렌 및 폴리스티렌 공중합체[참조: Merrifield, Biochemistry, 3:1385-1390 (1964); Berg et al., in Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap., Int. Symp., 1st, Epton, Roger (Ed), pp. 453-459 (1990); Berg et al., Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 20th, Jung, G. et al. (Eds), pp. 196-198 (1989); Berg et al., J. Am. Chem. Soc., 111:8024-8026 (1989); Kent et al., Isr. J. Chem., 17:243-247 (1979); Kent et al., J. Org. Chem., 43:2845-2852 (1978); Mitchell et al., Tetrahedron Lett., 42:3795-3798 (1976); U.S. Patent No. 4,507,230; U.S. Patent No. 4,006,117; and U.S. Patent No. 5,389,449]. 이러한 물질에는 중합체 및 공중합체, 예를 들면, 폴리비닐알코올, 아크릴레이트 및 아크릴산, 예를 들면, 폴리에틸렌-코-아크릴산, 폴리에틸렌-코-메타크릴산, 폴리에틸렌-코-에틸아크릴레이트, 폴리에틸렌-코-메틸 아크릴레이트, 폴리프로필렌-코-아크릴산, 폴리프로필렌-코-메틸-아크릴산, 폴리프로필렌-코-에틸아크릴레이트, 폴리프로필렌-코-메틸 아크릴레이트, 폴리에틸렌-코-비닐 아세테이트, 폴리프로필렌-코-비닐 아세테이트, 및 산 무수물 그룹을 함유하는 것, 예를 들면, 폴리에틸렌-코-말레산 무수물 및 폴리프로필렌-코-말레산 무수물로부터 제조된 것이 포함된다. 리포좀이 또한, 친화적 정제를 위한 고체 지지체로서 사용되어 왔다[참조: Powell et al. Biotechnol. Bioeng., 33:173 (1989)].

단백질 및 기타 생체분자를 고체 또는 액체 지지체 상에 고정화시키기 위한 수 많은 방법이 개발되어 왔다[참조: Mosbach, Methods in Enzymology, 44 (1976); Weetall, Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides, (1975); Kennedy et al., Solid Phase Biochemistry, Analytical and Synthetic Aspects, Scouten, ed., pp. 253-391 (1983); see, generally, Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology, Vol. 34, ed. W. B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. (1974); and Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 42, ed. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. (1974)].

가장 통상적으로 사용되고 있는 방법으로는, 당업자에게 공지되어 있는, 흡수 및 흡착 방법; 또는 직접적으로 또는 링커, 예를 들면, 수 많은 디설파이드 결합, 티오에테르 결합, 장애된 디설파이드 결합, 및 자유 반응성 그룹(예: 아민 및 티올 그룹) 간의 공유 결합을 통하여 지지체에 공유 결합되는 방법이 있다[참조: the PIERCE CATALOG, ImmunoTechnology Catalog amp; Handbook, 1992-1993(이에는 상기 시약의 제조 및 용도가 기재되어 있고, 이러한 시약에 대한 공급원을 제공해준다); Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking, CRC Press (1993); see also DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6909 (1993); Zuckermann et al., J. Am. Chem. Soc., 114:10646 (1992); Kurth et al., J. Am. Chem. Soc., 116:2661 (1994); Ellman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:4708 (1994); Sucholeiki, Tetrahedron Lttrs., 35:7307 (1994); Su-Sun Wang, J. Org. Chem., 41:3258 (1976); Padwa et al., J. Org. Chem., 41:3550 (1971); and Vedejs et al., J. Org. Chem., 49:575 (1984)(이에는 감광성 링커가 기재되어 있다)].

고정화를 수행하기 위해, 단백질 또는 기타 생체분자를 함유하는 조성물을 알루미나, 카본, 이온 교환 수지, 셀룰로즈, 유리 또는 세라믹 등의 지지체 물질과 접촉시킨다. 생체분자를 흡착에 의해 이에 부착시키기 위한 지지체로서 플루오로카본 중합체가 사용되어 왔다[참조: 미국 특허 제3,843,443호; PCT 국제공개공보 WO 86/03840].

J. 예후 및 진단

CVSP14 폴리펩티드 단백질, 이의 도메인, 동족체 및 유도체, 및 이를 암호화하는 핵산(및 이에 대한 상보적 서열), 및 항-CVSP14 폴리펩티드 항체가 특히 경부암, 결장암 또는 췌장암의 진단에 사용될 수 있다. 이러한 분자는 CVSP14 폴리펩티드 발현에 영향을 미치는 각종 질환, 질병 및 장애를 검출, 예후, 진단 또는 모 니터하거나, 또는 이의 치료를 모니터하기 위한 검정, 예를 들면, 면역검정에 사용될 수 있다. 본원의 목적상, CVSP14s가 체액 또는 종양 조직에 존재하는 것에 특히 관심이 있다.

특히, 상기 면역검정은 환자로부터 유래된 샘플을, 특이적 결합이 일어날 수 있는 조건하에 항-CVSP14 폴리펩티드 항체와 접촉시키고, 이러한 항체에 의한 모든 특이적 결합량을 검출 또는 측정함을 포함하는 방법에 의해 수행된다. 조직 절편에서의 상기 항체의 결합을 이용하여, 비정상적인 CVSP14 폴리펩티드 국재화 또는 비정상적(예를 들면, 증가, 감소 또는 부재) 수준의 CVSP14 폴리펩티드를 검출할 수 있다. 특정 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여, 환자 조직 또는 혈청 샘플 내에 CVSP14 폴리펩티드가 존재하는지를 검정할 수 있는데, 비저상적 수준의 CVSP14 폴리펩티드는 질병에 걸린 상태에 대한 지표가 된다.

사용될 수 있는 면역검정에는 웨스턴 블롯, 방사성면역검정, ELISA(효소 연결 면역흡착성 검정), '샌드위치' 면역검정, 면역침전 검정, 침전 반응, 겔 확산 침전 반응, 면역확산 검정, 응집 검정, 보체-고정화 검정, 면역방사선측정 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 사용하는 경쟁적 및 비-경쟁적 검정 시스템이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

CVSP14 폴리펩티드 유전자 및 관련 핵산 서열 및 아서열(상보 서열 포함)이 또한, 하이브리드화 검정에 사용될 수 있다. 약 8개 이상의 뉴클레오티드, 일반적으로 14 또는 16 또는 30개 이상, 일반적으로 1000개 미만 또는 100개 이

하의 연속되는 뉴클레오티드를 함유하는 CVSP14 폴리펩티드 핵산 서열 또는 이의 아서열을 하이브리드화 프로브로서 사용할 수 있다. 하이브리드화 검정을 사용하여, 본원에 기재된 바와 같은 CVSP14 폴리펩티드 발현 및/또는 활성 상의 이상한 변화와 연관된 질환, 장애 또는 질병 상태를 검출, 예후, 진단 또는 모니터할 수 있다. 특히, 상기 하이브리드화 검정은 핵산을 함유하는 샘플을, 하이브리드화가 일어날 수 있는 조건하에 CVSP14 폴리펩티드 암호화 DNA 또는 RNA와 하이브리드화할 수 있는 핵산 프로브와 접촉시킨 다음, 발생된 하이브리드화를 검출 또는 측정하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행된다.

특정 양태에서는, 피검자에게서 비정상적 수준의 CVSP14 폴리펩티드를 검출하는 것을 특징으로 하는 질병 또는 장애의 진단 방법은, 이러한 피검자로부터 유래된 샘플 중의 CVSP14 폴리펩티드의 기능적 활성 수준 또는 DNA, RNA 또는 단백질 수준을 측정함으로써 제공되는데, 이러한 CVSP14 폴리펩티드의 기능적 활성 수준 또는 DNA, RNA 또는 단백질 수준이, 질병이나 장애를 갖지 않는 유사한 샘플 중에서 발견되는 기능적 활성 또는 DNA, RNA 또는 단백질 수준과 비교해서 증가 또는 감소한다는 것은, 피검자에게 질병이나 장애가 존재한다는 것을 지시해준다.

하나 이상의 용기 내에 항-CVSP14 폴리펩티드 항체, 및 임의로 이러한 항체에 대한 표지된 결합 파트너를 함유하는 진단용 키트가 또한 제공된다. 또 다른 한편, 상기 항-CVSP14 폴리펩티드 항체를 검출 가능한 마커, 예를 들면, 화학발광성, 효소적, 형광성 또는 방사성 잔기로 표지시킬 수 있다. 하나 이상의 용기 내에 SP 단백질-암호화 RNA와 하이브리드화할 수 있는 핵산 프로브를 포함하는 키트가 또한 제공된다. 특정 양태에서는, 키트가 하나 이상의 용기 내에, SP 단백질 암호화 핵산의 적어도 일부를 증폭[예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(참조: Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), Qβ 레플리카제의 리가제 연쇄 반응(참조: EP 320,308) 사용, 사이클릭 프로브 반응, 또는 적당한 반응 조건하에 당해 분야에 공지된 기타 방법에 의해 수행됨]시킬 수 있는 한 쌍의 프라이머(예: 각각 크기 범위가 6-30개 뉴클레오티드이다)을 포함할 수 있다. 키트는 임의로, 한 용기 내에, 예를 들어, 표준물 또는 대조군으로서 사용하기 위한 예정량의 정제된 CVSP14 폴리펩티드 또는 핵산을 추가로 포함할 수 있다.

K. 약제학적 조성물 및 투여 방법

1. 조성물의 성분

CVSP14 폴리펩티드의 활성을 조절하는 것으로 동정된 화합물을 함유하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 또한, CVSP14 폴리펩티드의 활성을 조절해주는 화합물과 신생물성 장애를 치료하기 위한 또 다른 치료물 또는 치료용 화합물(예: 화학치료 화합물)의 조합물이 제공된다.

CVSP14 폴리펩티드 조절제와 항종양제는 함께, 순차적으로 또는 간헐적으로 투여하기 위해 별개의 조성물로서 포장할 수 있다. 또 다른 한편, 이들은 단일 투여용 조성물로서 제공될 수 있거나, 또는 단일 조성물로서 투여하기 위한 2개의 조성물로서 제공될 수 있다.

a. CVSP14 폴리펩티드 억제제

단독으로 사용되거나 기타 화합물과 조합하여 사용될 때, 바람직하지 못하고/못하거나 제어 불가능한 수준의 혈관형성을 포함한 신생물성 질병과 연관된 진단 마커 또는 임상적 증상을 경감, 감소, 개선 또는 예방하거나, 이러한 증상의 완화 상태를 제공 또는 유지시킬 수 있는, 본원에 기재된 것을 포함한 CVSP14 폴리펩티드 억제제를 본 발명의 조합물에 사용될 수 있다.

한 양태에 있어서, CVSP14 폴리펩티드 억제제는 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인과 특이적으로 반응하는 항체 또는 이의 단편; CVSP14 폴리펩티드 생성 억제제; CVSP14 폴리펩티드 막-국재화 억제제; 또는 CVSP14 폴리펩티드의 발현, 또는 특히 이의 활성에 대한 모든 억제제이다.

b. 항-혈관형성제 및 항종양제

단독으로 사용되거나 기타 화합물과 조합하여 사용될 때, 바람직하지 않고/않거나 조절되지 않은 혈관형성 및/또는 종양 성장과 전이, 특히 고형 신생물, 혈관 기형 및 심혈관계 장애, 만성 염증 질병 및 비정상적 상처 치유, 순환계 장애, 능선(crest) 증상, 피부 장애, 또는 안과 장애와 연관된 진단 마커 또는 임상적 증상을 경감, 감소, 개선 또는 예방하거나, 이러한 증상의 완화 상태를 제공 또는 유지시킬 수 있는, 본원에 기재된 것을 포함한 모든 항-혈관형성제 및 항종양제를 본 발명의 조합물에 사용될 수 있다. 또한, CVSP14 폴리펩티드의 억제제와 조합하여 사용하기 위한 항종양제가 고려된다.

c. 항종양제 및 항-혈관형성제

본원에 제공된 방법에 의해 동정되거나 본원에 제공된 화합물은 항종양제 및/또는 항-혈관형성제와 조합하여 사용될 수 있다.

2. 제형 및 투여 경로

본원의 화합물 및 제제는 전형적으로 단일 투여량 투여를 위해 약제학적 조성물로서 제형화할 수 있다. 이러한 제형 중의 화합물의 농도는 투여시, 의도한 치료에 유효한 양을 전달하기에 유효한 것이다. 전형적으로, 조성물은 단일 투여량 투여용으로 제형화시킨다. 조성물을 제형화하기 위해, 특정 화합물 또는 이의 혼합물의 중량 분획을, 치료하고자 하는 질환이 제거 또는 경감되도록 하는데 유효한 농도에서 선택된 비히클 중에 용해, 현탁, 분산 또는 분산시킨다. 본원에 제공된 화합물의 투여에 적합한 약제학적 담체 또는 비히클에는 특정한 투여 방식에 적합한 것으로 당업자에게 공지된 모든 담체가 포함된다.

또한, 화합물은 조성물 중에 유일한 약제학적 활성 성분으로서 제형화되거나 또는 기타 활성 성분과 조합될 수 있다. 조직 표적화 리포좀을 포함한 리포좀 현탁액이 또한, 약제학적으로 허용되는 담체로서 적합할 수 있다. 이들은 당업자에게 공지된 방법에 따라서 제조할 수 있다. 예를 들어, 리포좀 제형은 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.

활성 화합물은 치료하고자 하는 환자에 대한 바람직하지 않은 부작용의 부재하에 치료학적으로 유용한 효과를 발휘하기에 충분한 양으로, 약제학적으로 허용되는 담체에 포함된다. 치료학적 유효 농도는 해당 화합물을 공지된 시험관내 및 생체내 시스템, 예를 들면, 본원에 제공된 검정에 의해 시험함으로써 실험적으로 결정할 수 있다.

약물 조성물 중의 활성 화합물의 농도는 이러한 활성 화합물의 흡수율, 불활성화율 및 배출률, 화합물의 물리화학적 특징, 투여 스케쥴, 및 투여된 양 뿐만 아 니라 당업자에게 공지된 기타 요인에 좌우된다.

전형적으로, 치료학적 유효량이 고려된다. 투여된 양은 혈액 용량의 0.001 내지 1mg/ml 순서에 근거하며, 이에는 약 0.005 내지 0.05mg/ml 및 약 0.01mg/ml이 포함된다. 약제학적 투여 단위 형태는, 투여 단위 형태당 필수 활성 성분 또는 필수 활성 성분의 조합물을 약 1mg 내지 약 1000mg, 일반적으로 약 10 내지 약 500mg 및 약 25 내지 75mg 제공하도록 제조한다. 정확한 투여량은 실험적으로 결정할 수 있다.

활성 성분은 1회 투여하거나, 또는 시간 간격을 두고 투여되는 다수의 보다 작은 투여량으로 분할될 수 있다. 정확한 투여량과 투여 기간은 치료하고자 하는 질병에 따라서 다양하며, 이는 공지된 시험 프로토콜을 사용하거나 생체내 또는 시험관내 시험 데이터로부터 외삽함으로써 실험적으로 결정할 수 있다는 것을 인지해야 한다. 농도 및 투여량은 경감시키고자 하는 질환의 중증도에 따라 다양할 수 있다는 것을 또한 인지해야 한다. 특정한 피검자 모두에 대해, 특수 투여량 섭생은 개개인의 필요성과 조성물을 투여하거나 이러한 조성물 투여를 관리하는 사람의 전문적인 판단에 따라서 일정 시간에 걸쳐 조절해야 하고, 본원에 제시된 농도 범위는 단지 예시적이고, 이로써 청구된 조성물 및 이를 함유하는 조합물의 범위 또는 용도가 제한되지 않는다는 것을 추가로 인지해야 한다.

약제학적으로 허용되는 유도체에는 산, 염, 에스테르, 수화물, 용매화물 및 프로드럭 형태가 포함된다. 유도체는 전형적으로 이의 약력학적 특성이 상응하는 중성 화합물 보다 우수한 것을 선택된다.

따라서, 본원에 제공된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 유도체 하나 이상의 유효 농도 또는 유효량을, 전신, 국부 또는 국소 투여에 적합한 약제학적 담체 또는 비히클과 혼합하여 약제학적 조성물을 형성한다. 화합물은 치료하고자 하는 장애를 개선 또는 치료하는데 유효한 양으로 포함된다. 해당 조성물 중의 활성 화합물의 농도는 활성 화합물의 흡수, 불활성화, 배출률, 투여 스케쥴, 투여된 양, 특정한 제형 뿐만 아니라 당업자에게 공지된 기타 요인들에 좌우된다.

비경구, 피내, 피하 또는 국부 투여에 사용된 용제 또는 현탁제는 다음 성분들을 포함할 수 있다: 멸균성 희석제, 예를 들면, 주사용수, 식염 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항미생물제, 예를 들면, 벤질 알코올 및 메틸 파라벤; 산화방지제, 예를 들면, 아스코르브산 및 중아황산나트륨; 킬레이트제, 예를 들면, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 완충제, 예를 들면, 아세테이트, 시트레이트 및 포스페이트; 및 강장성 조정제, 예를 들면, 염화나트륨 또는 덱스트로즈. 비경구 제제는 앰풀, 1회용 주사기, 또는 유리, 플라스틱 또는 기타 적합한 재료로 만든 1회분 또는 수 회분 용량의 바이알에 봉입시킬 수 있다.

화합물이 불충분한 용해도를 나타내는 경우에는, 화합물을 가용화시키는 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 이에는 조용매, 예를 들면, 디메틸설폭사이드(DMSO)를 사용하는 방법, 계면활성제(예: Tween)을 사용하는 방법, 또는 수성 중탄산나트륨에 용해시키는 방법이 포함되지만, 이에 제 한되지 않는다. 이러한 화합물의 유도체, 예를 들면, 해당 화합물의 프로드럭이 유효한 약제학적 조성물을 제형화하는데 사용될 수도 있다. 안과용인 경우에는, 조성물을 안과적으로 허용되는 담체에서 제형화시킬 수 있다. 본원에서 안과용인 경우에는, 국부 또

는 주사에 의한 국소 투여가 고려된다. 서방출 제형이 또한 요망되기도 한다. 전형적으로, 조성물은 단일 투여용으로 제형화되어, 1회분에 유효량이 투여되도록 한다.

화합물을 비히클과 혼합 또는 부가하면, 생성된 혼합물은 용액, 현탁액, 에멀션 또는 기타 조성물일 수 있다. 생성된 혼합물의 형태는 의도한 투여 방식, 및 선택된 담체 또는 비히클 중의 화합물의 용해도를 포함한 수 많은 요인들에 좌우된다. 필요한 경우, 화합물의 약제학적으로 허용되는 염 또는 기타 유도체가 제조된다.

화합물은 약제학적으로 허용되는 담체 내에, 치료받는 환자에 대해 바람직하지 못한 부작용은 나타내지 않으면서 치료학적으로 유용한 효과를 발휘하기에 충분한 양으로 포함된다. 부작용 횟수와 정도는 화합물이 투여되는 피검자의 질환에 따라서 결정된다는 것을 인지해야 한다. 예를 들면, 생명을 위협하는 질병을 치료할 때는 관용되던 특정 독성의 바람직하지 못한 부작용이, 이 보다 덜한 질병을 치료할 때는 관용되지 않을 수 있다.

화합물은 또한, 목적하는 작용에 손상을 입히지 않는 기타 활성 물질이나, 당업자에게 공지된 목적 작용을 보충해주는 물질과 혼합할 수 있다. 본원에서 사용하기 위한 제제 및 화합물의 제형에는 경구, 직장, 국부, 흡입, 볼내(예: 설하), 비경구(예: 피하, 근육내, 피내 또는 정맥내), 경피 투여 또는 기타 모든 경로에 적합한 것이 포함된다. 소정의 모든 경우에 있어 가장 적합한 경로는 치료받는 질환의 종류 및 중증도와, 사용되는 특정한 활성 화합물의 성질에 좌우된다. 이러한 제형은 적합한 양의 해당 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 유도체를 함유하는 단위 투여형, 예를 들면, 정제, 캅셀제, 환제, 산제, 과립제, 멸균성 비경구 용제 또는 현탁제, 및 경구용 용제 또는 현탁제, 및 유-수 에멀션 형태로 사람과 동물에게 투여된다. 약제학적 치료학적으로 활성인 화합물 및 이의 유도체는 전형적으로, 단위 투여형 또는 다중 투여형으로 제형화되어 투여된다. 본원에 사용된 바와 같은 단위 투여형은 사람과 동물 피검자에 적합하고 당해 분야에 공지된 바와 같이 개별적으로 패키징될 수 있는, 물리적으로 별개인 단위를 지칭한다. 각각의 단위 투여는 요구되는 약제학적 담체, 비히클 또는 희석제와 연합하여, 목적하는 치료 효과를 가져다 주기에 충분한 치료학적 활성 화합물의 예정된 양을 함유한다. 단위 투여형의 예에는 앰풀 및 주사기, 및 개별적으로 패키징된 정제 또는 캅셀제가 포함된다. 단위 투여형은 분획 또는 이의 수 회분으로 나누어 투여될 수 있다. 다중 투여형은 분리된 단위 투여형으로 투여하고자 하는 단일 용기 내에 패키징된 다수의 동일한 단위 투여형태이다. 다중 투여형의 예에는 바이알, 정제 또는 캅셀제의 병, 또는 파인트 또는 갤론 병이 포함된다. 따라서, 다중 투여형은 분리되지 않고 패키징되어 있는 다수의 단위 투여형태이다.

당해 조성물은 활성 화합물과 함께 다음 성분들을 함유할 수 있다: 희석제, 예를 들면, 락토즈, 슈크로즈, 인산이칼슘, 또는 카복시메틸셀룰로즈; 윤활제, 마 그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트 및 탈크; 및 결합제, 예를 들어, 전분, 천연 검(예: 아카시아 검), 젤라틴, 글루코즈, 몰라세, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈 및 이의 유도체, 포비돈, 크로스포비돈, 및 당업자에게 공지된 기타 결합제. 약제학적으로 투여가능한 액상 조성물은 예를 들어, 상기 정의된 바와 같은 활성 화합물 및 임의의 약제학적 아쥬반트를 담체, 예를 들면, 물, 식염수, 수성 덱스트로즈, 글리세롤, 글리콜, 에탄올 등에 용해, 분산 또는 혼합함으로써 용제 또는 현탁제를 형성함으로써 제조할 수 있다. 경우에 따라, 투여하고자 하는 약제학적 조성물이 미량의 비독성 보조 물질, 예를 들면, 습윤제, 유화제 또는 가용화제, pH 완충제 등, 예를 들면, 아세테이트, 나트륨 시트레이트, 사이클로덱스트린 유도체, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 나트륨 아세테이트, 트리에탄올아민 올레에이트, 및 기타 제제를 함유할 수도 있다. 이러한 투여형의 제조 방법은 공지되어 있거나 또는 당업자에게 명백할 것이다[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975]. 투여될 조성물 또는 제형은 치료하고자 하는 피검자의 증상을 경감시키기에 충분한 양의 활성 화합물을 함유한다.

활성 성분을 0.005 내지 100% 범위로 함유하고 나머지는 비독성 담체로 구성된 투여형 또는 조성물을 제조할 수 있다. 경구 투여의 경우, 약제학적 조성물은약제학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면, 결합제(예: 예비젤라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈); 충진제(예: 락토즈, 미세결정성 셀룰로즈 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예: 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 붕해제(예: 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예: 나트륨 라우릴 설페이트)를 이용하여 통상적인 수단에 의해 제조된 형태, 예를 들면, 정제 또는 캅셀제 형태를 취할 수 있다. 정제를 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 피복시킬 수 있다.

약제학적 제제는 또한, 액상 형태, 예를 들면, 용제, 시럽제 또는 현탁제 형태일 수 있거나, 또는 사용하기 전에 물 또는 기타 적합한 비히클로 재구성하기 위한 약물 제품으로서 제시될 수도 있다. 이러한 액상 제제는 약제학적으로 허용되는 부가제, 예를 들면, 현탁화제(예: 솔비톨 시럽, 셀룰로즈 유도체 또는 수소화 식용 지방); 유화제(예: 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클(예: 아몬드 오일, 오일상 에스테르, 또는 분획화 식물성 오일); 및 방부제(예: 메틸 또는 프로필 p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)를 이용하여 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다.

직장 투여에 적합한 제형은 단위 투여 좌제로서 제시될 수 있다. 이들은 활성 화합물을 하나 이상의 통상적인 고형 담체, 예를 들면, 코코아 버터와 혼합한 다음, 생성된 혼합물의 외형을 제조함으로써 제조할 수 있다.

피부 또는 눈에 국소 투여하는데 적합한 제형은 일반적으로, 연고, 크림, 로션, 페이스트, 겔, 스프레이, 에어로솔 및

오일로서 제형화된다. 사용될 수 있는 담체에는 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 알코올, 및 이들의 둘 이상의 조합물이 포함된다. 국부용 제형이 하이드록시프로필 메틸 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리 (알킬렌 글리콜), 폴리/하이드록시알킬, (메트)아크릴레이트 또는 폴리(메트)아크릴아미드 중에서 선택된 증점제를 0.05 내지 15중량% 함유하는 것이 추가로 유리할 수 있다. 국부 제형은 종종 점적 주입에 의해 적용하거나 또는 연고로서 결막낭 내로 적용한다. 눈, 안면동 및 외이도를 자극 또는 윤활을 위해 사용할 수도 있다. 안구 공동 앞 또는 기타 위치 내로 주사할 수도 있다. 액상 형태의 국소 제형은 또한, 스트립, 콘택트 렌즈, 및 활성 성분이 방출되는 기타 형태의 친수성 3차원적 중합체 매트릭스로 제시될 수 있다.

흡입 투여의 경우, 본원에서 사용하기 위한 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우에는, 계량된 량이 전달되도록 하는 밸브를 장착함으로써 투여 단위를 결정할 수 있다. 해당 화합물의 분말 혼합물과 적합한 분말 기재, 예를 들면, 락토즈 또는 전분을 함유하는, 흡입기에 사용하기 위한 예를 들어, 젤라틴 카트리지 및 캡슐을 제형화할 수 있다.

볼내(설하) 투여용으로 적합한 제형에는, 예를 들어, 활성 화합물을 향미 기재, 통상적으로 슈크로즈 및 아카시아 또는 트라가칸드 중에 함유하는 로젠지; 및 해당 화합물을 불활성 기재, 예를 들면, 젤라틴 및 글리세린 또는 슈크로즈 및 아카시아 중에 함유하는 향정(pastille)이 포함된다.

화합물은 주사, 예를 들어, 거환 주사 또는 연속식 주입에 의해 비경우 투여용으로 제형화할 수 있다. 주사용 제형은 방부제가 부가된 단위 투여형, 예를 들면, 앰풀 또는 수 회분 용기에 제시될 수 있다. 이러한 조성물은 오일상 또는 수성 비히클 중의 현탁제, 용제 또는 에멀션일 수 있고, 제형화제, 예를 들면, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 또 다른 한편, 활성 성분은 사용 전에, 적합한 비히클, 예를 들면, 멸균성 피로겐-비함유 물 또는 기타 용매과 재구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

경피 투여용으로 적합한 제형은 장기간 동안 수용자의 표피와 친밀하게 접촉하도록 적응시킨 별개의 패치 형태로 제시될 수 있다. 이러한 패치는 활성 화합물을, 이러한 활성 화합물에 대해 0.1 내지 0.2M 농도의 임의의 완충 수용액으로서 함유하는 것이 적합하다. 경피 투여용으로 적합한 제형은 이온영동[참조: Pharmaceutical Research 3 (6), 318 (1986)]에 의해 전달될 수 있고, 이는 전형적으로, 활성 화합물의 임의의 완충 수용액 형태를 취할 수 있다.

약제학적 조성물은 또한 서방성 수단 및/또는 전달 장치에 의해 투여될 수 있다[참조: 미국 특허 3,536,809; 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,610; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,566; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 및 5,733,566].

목적하는 혈액 수준은 혈장 수준으로써 확인된 바와 같은 활성제를 연속적으로 주입함으로써 유지시킬 수 있다. 담당의는 독성, 또는 골수, 간 또는 신장 기능장애로 인해 투여량을 보다 적게 하는 치료법으로 조절하거나, 투여를 종결 또는 중단시키는 시기와 방법을 알고 있다는 것을 인지해야만 한다. 역으로 말하면, 담당의는 임상 반응이 적당치 않을 경우에는(독성의 부작용은 미리 배제시킴), 보다 높은 수준으로 투여하는 시기와 방법을 알고 있을 것이다.

단독으로 사용되거나 또는 기타 제제와 조합하여 사용되는 CVSP14 폴리펩티드 억제제(들)의 효능 및/또는 독성은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 평가할 수 있다[참조: O'Reilly, Investigational New Drugs, 15:5-13 (1997)].

활성 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 유도체는, 이러한 화합물이 신체로부터 신속하게 제거되지 못하게 하는 담체, 예를 들면, 서방출 제형 또는 피복제와 함께 제조될 수 있다.

조성물 및/또는 조합물과 함께 이의 투여에 대한 지시사항을 함유하는 키트가 제공된다. 이러한 키트는 상기 복합체를 주사하기 위한, 전형적으로 멸균 포장된 바늘 또는 주사기, 및/또는 포장된 알코올 패드를 추가로 포함할 수 있다. 임상의 또는 환자가 해당 활성제를 투여할 수 있도록 한 지시사항이 임의로 포함된다.

최종적으로, 화합물 또는 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 프로테아제 도메인, 또는 전술된 제제 중의 어떠한 것을 포함하는 조성물은 포장 재료; 이러한 포장 재료 내의, 본원에서 고려된 질병 또는 장애를 치료하는데 유효한, 본원에 제공된 화합물 또는 이의 적합한 유도체; 및 상기 화합물 또는 이의 적합한 유도체가 본원에서 고려된 질병 또는 장애를 치료하는데 사용된다고 지시한 표지를 함유하는 제품으로서 패키징될 수 있다. 이러한 표지에는 치료하고자 하는 장애가 임의로 기재되어 있다.

L. 치료 방법

본원의 방법에 의해 동정된 화합물은 동물, 특히 포유동물(사람 포함)에게서 신생물성 질병을 치료 또는 예방하는데 사용된다. 한 양태에서는, 이러한 방법이 유효량의 CVSP14 폴리펩티드 억제제를 포유동물에게 투여함으로써, 질병

또는 장애를 치료 또는 예방하는 것을 포함한다.

한 양태에서는, 상기 치료 또는 예방에 사용된 CVSP14 폴리펩티드 억제제를 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 투여한다. 치료된 포유동물이 사람일 수 있다. 본원에 제공된 억제제는 스크리닝 검정에 의해 동정된 것이다. 또한, 항체 및 안티센스 핵산 또는 이본쇄 RNA(dsRNA), 예를 들면, RNAi가 고려된다.

상기 치료 또는 예방 방법은 CVSP14 폴리펩티드 억제제를 투여하는 것과 동시에, 또는 투여하기 전 또는 후에, CVSP14 폴리펩티드의 활성을 억제시키는 것으로 동정된 어떠한 화합물일 수도 있는 항-혈관형성성 치료 또는 제제 또는 항종양제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 화합물에는 작은 분자 조절제; CVSP14 폴리펩티드에 대한 이의 결합 영역을 함유하는 항체 또는 이의 단편 또는 유도체; CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 안티센스 핵산 또는 이본쇄 RNA(dsRNA), 예를 들면, RNAi; 및 이종 서열이 CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 적어도 일부분의 생물학적 활성을 불활성화시키도록 상기 이종 뉴클레오티드 서열을 삽입시킨 CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 적어도 일부분을 함유하는 핵산[여기서, CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 부분은 상기 이종 서열과 플랭킹하여, CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 게놈성 유전자와의 상동 재조합을 증진시킨다]이 포함된다. 또한, 상기 분자는 일반적으로, 길이가 약 1000nt 미만이다.

1. 안티센스 치료

특정 양태에서는, 상기 언급된 바와 같이, CVSP14 폴리펩티드 기능이 CVSP14 폴리펩티드 안티센스 핵산에 의해 저하 또는 억제되어, 신생물성 질병을 치료 또는 예방한다. CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 일부분을 암호화하는 유전자 또는 cDNA에 대해 안티센스인 6개 이상의 뉴클레오티드의 핵산이 치료학적 또는 예방적으로 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 CVSP14 폴리펩티드 '안티센스'는 몇몇 서열 상보성을 통하여, 일반적으로 높은 엄격성 조건하에, CVSP14 폴리펩티드 RNA(일반적으로 mRNA)의 일부분과 하이브리드화할 수 있는 핵산을 지칭한다. 이러한 안티센스 핵산은 CVSP14 폴리펩티드 mRNA의 암호화 및/또는 비-암호화 영역에 상보적일 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 CVSP14 폴리펩티드 기능을 저하 또는 억제시키는 치료제로서 유용하고, 상기 언급된 바와 같은 장애를 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

CVSP14 폴리펩티드 안티센스 핵산은 6개 이상의 뉴클레오티드이고, 일반적으로 올리고뉴클레오티드(6 내지 약 150개 뉴클레오티드의 범위이고, 이에는 6 내지 50개 뉴클레오티드가 포함된다)이다. 안티센스 분자는 프로테아제 도메인의 전부 또는 일부분에 대해 상보적일 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 10개 이상의 뉴클레오티드, 15개 이상의 뉴클레오티드, 100개 이상의 뉴클레오티드 또는 125개 이상의 뉴클레오티드이다. 올리고뉴클레오티드는 일본쇄 또는 이본쇄 DNA 또는 RNA, 또는 이의 키메릭 혼합물 또는 유도체 또는 변형물일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 염기 잔기, 당 잔기 또는 인산염 주쇄에서 변형된 것일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 기타 첨부된 그룹, 예를 들면, 펩티드, 또는 세포 막내로의 수송을 촉진시키는 제제[참조: Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556 (1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:648-652 (1987); PCT Publication No. WO 88/09810, published December 15, 1988)] 또는 혈액-뇌 장벽 내로의 수송을 촉진시키는 제제[참조: PCT Publication No. WO 89/10134, published April 25, 1988)], 하이브리드화-촉발된 절단 제제[참조: Krol et al., BioTechniques 6:958-976 (1988)] 또는 삽입제[참조: Zon, Pharm. Res. 5:539-549 (1988)]를 포함할 수 있다.

CVSP14 폴리펩티드 안티센스 핵산은 일반적으로 올리고뉴클레오티드, 전형적으로 일본쇄 DNA 또는 RNA 또는 이의 동족체 또는 혼합물이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 사람 CVSP14 폴리펩티드의 일부분에 안티센스인 서열을 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 당해 분야에 공지된 치환체를 사용하여, 이의 구조 상의 어느 위치에서도 변형시킬 수 있다.

CVSP14 폴리펩티드 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카복시하이드록실메틸) 우라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카복시메틸아미노메틸우라실, 디하이드로우라실, 베타-D-갈락토실퀴에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실퀴에오신, 5'-메톡시카복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 위부톡소신, 슈도우라실, 퀴에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산(v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카복시프로필) 우라실, (acp3)w 및 2,6-디아미노푸린이 포함되지만, 이에 제한되지 않는 그룹 중에서 선택되는 하나 이상의 변형된 염기 잔기를 포함할 수 있다.

또 다른 양태에서는, 올리고뉴클레오티드는 아라비노즈, 2-플루오로아라비노즈, 크실로즈 및 헥소즈를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 변형된 당 잔기를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미도티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포르디아미데이트, 메틸포스

포네이트, 알킬 포스포트리에스테르 및 포름아세탈, 또는 이들의 동족체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 변형된 당 잔기를 포함할 수 있다.

올리고뉴클레오티드는 α-아노머성 올리고뉴클레오티드일 수 있다. α-아모머성 올리고뉴클레오티드는 상보성 RNA와 특이적 이본쇄 하이브리드를 형성하는데, 상기 쇄는 서로 나란히 수행된다[참조: Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15:6625-6641 (1987)].

올리고뉴클레오티드는 또 다른 분자, 예를 들면, 펩티드, 하이브리드화 촉발된 가교결합제, 수송제 및 하이브리드화 촉발된 절단제와 접합시킬 수 있다.

올리고뉴클레오티드는 당해 분야에 공지된 표준 방법, 예를 들면, 자동화 DNA 합성기(예를 들면, Biosearch, Applied Biosystems 등으로부터 입수 가능함)를 사용함으로써 합성할 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는 문헌[참조: Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)]의 방법에 의해 합성할 수 있고, 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오티드는 제어된 다공성 유리 중합체 지지체를 사용함으로써 제조할 수 있다[참조: Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451 (1988)].

특정 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드 안티센스 올리고뉴클레오티드가 촉매적 RNA 또는 리보자임을 포함한다[참조: PCT International Publication WO 90/11364, published October 4, 1990; Sarver et al., Science 247:1222-1225 (1990)]. 또 다른 양태에서는, 올리고뉴클레오티드가 2'-0-메틸리보뉴클레오티드[참조: Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15:6131-6148 (1987)], 또는 키메라 RNA-DNA 동족체[참조: Inoue et al., FEBS Lett. 215:327-330 (1987)]이다. 또 다른 한편, 올리고뉴클레오티드는 이본쇄 RNA(dsRNA), 예를 들면, RNAi일 수 있다.

또 다른 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드 안티센스 핵산이 외인성 서열로부터의 전사에 의해 세포내에서 생성된다. 예를 들어, 벡터를 생체내 도입하여, 이러한 벡터 또는 이의 일부분이 전사되는 세포에 의해 흡수되어 안티센스 핵산(RNA)을 생성시킨다. 이러한 벡터는 CVSP14 폴리펩티드 안티센스 핵산을 암호화하는 서열을 함유할 것이다. 상기 벡터는 이것이 목적하는 안티센스 RNA를 생성하도록 전사될 수 있는 한은, 염색체내로 통합되거나 에피좀으로 유지될 수 있다. 상기 벡터 는 당해 분야에서 표준인 재조합 DNA 기술에 의해 작제할 수 있다. 벡터는 포유동물 세포에서 복제 및 발현하는데 사용된, 플라스미드, 바이러스성 또는 당해 분야에 공지된 기타 벡터일 수 있다. CVSP14 폴리펩티드 안티센스 RNA를 암호화하는 서열의 발현은 사람을 포함하는 포유동물 세포에서 작용하는 것으로 당해 분야에 공지된 모든 프로모터에 의해 수행될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 또는 구성성일 수 있다. 상기 프로모터에는 다음이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다: SV40 초기 프로모터 영역[참조: Bernoist and Chambon, Nature 290:304-310 (1981)], 라우스 육종 바이러스의 3' 장 말단 반복체에 함유된 프로모터[참조: Yamamoto et al., Cell 22:787-797 (1980)], 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터[참조: Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445 (1981)], 메탈로티오네인 유전자의 조절성 서열[참조: Brinster et al., Nature 296:39-42 (1982)] 등.

상기 안티센스 핵산은 사람 CVSP14 폴리펩티드 유전자를 포함한 CVSP14 폴리펩티드 유전자의 RNA 전사체의 적어도 일부분과 상보적인 서열을 포함한다. 절대 상보성이 요구되지는 않는다.

신생물성 질병의 치료 또는 예방에 유효한 CVSP14 폴리펩티드 안티센스 핵산(dsRNA)의 양은 질병의 종류에 따라 좌우되고, 이는 표준 임상 기술에 의해 실험적으로 결정할 수 있다. 가능한 경우, 세포 중의 안티센스 세포독성을 시험관내에서 결정한 다음, 유용한 동물 모델 시스템에서 결정한 후에, 사람에게 시험하고 사용한다.

2. RNA 간섭

RNA 간섭(RNAi)[참조: Chuang et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:4985]을 이용하여, CVSP14를 암호화하는 유전자의 발현을 억제시킬 수 있다. 간섭 RNA(RNAi) 단편, 특히 이본쇄(ds) RNAi를 사용하여, CVSP14 기능을 상실시킬 수 있다. 포유동물, 씨. 엘레간스(C. elegans), 드로소필라(Drosophila) 및 식물을 포함한 유기체, 및 사람에게 RNAi를 사용하는 것과 관련된 방법이 공지되어 있다[참조: Fire et al. (1998) Nature 391:806-811 Fire (1999) Trends Genet. 15:358-363; Sharp (2001) Genes Dev. 15:485-490; Hammond, et al. (2001) Nature Rev. Genet.2:110-1119; Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2:239-245; Hamilton et al. (1999) Science 286:950-952; Hammond et al. (2000) Nature 404:293-296; Zamore et al. (2000) Cell 101:25-33; Bernstein et al. (2001) Nature 409: 363-366; Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15:188-200; Elbashir et al. (2001) Nature 411:494-498; International PCT application No. WO 01/29058; International PCT application No. WO 99/32619)]. 이본쇄 RNA(dsRNA)-발현성 작제물은, 에피좀으로 유지되거나 게놈 내로 통합되는 복제성 벡터를 사용하여, 숙주, 예를 들면, 동물 또는 식물 내로 도입한다. 적당한 서열을 선택함으로써, dsRNA의 발현이 CVSP14를 암호화하는 내인성 mRNA의 축적을 방해할 수 있다. RNAi는 또한, 시험관내에서 발현을 억제하는데 사용될 수 있다. CVSP14에 대해 선택적인(즉, 고유한) 약 21개 이상(또는 21개) 뉴클레오티드를 포함하는 영역을 사용하여 RNAi를 제조한다. 약 21개 뉴클레오티드 보다 작은 단편을 세포 내로 직접 형 질전환시킬 수 있고, 보다 큰 RNAi dsRNA 분자는, 이를 암호

화하는 벡터를 사용하여 도입한다. dsRNA 분자는 길이가 약 21bp 이상, 예를 들면, 50, 100, 150, 200 이상이다.

3. 유전자 요법

예시 양태에서, CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 기능적 도메인 또는 유도체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산은 유전자 요법에 의해 CVSP14 폴리펩티드 기능을 증진시키기 위해 투여한다. 유전자 요법은 핵산을 피검자에게 투여함으로써 수행되는 치료법을 지칭한다. 이 양태에서, 핵산은 CVSP14 폴리펩티드 기능을 증진시킴으로써 치료학적 효과를 매개하는 이의 암호화된 단백질을 생성시킨다. 당해 분야에서 이용 가능한 유전자 요법을 위한 모든 방법이 사용될 수 있다[참조: Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, An. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIBTECH 11(5):155-215 (1993)]. 예를 들면, 유전자 요법을 위한 한 가지 치료학적 조성물은 적합한 숙주에서 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 도메인, 단편 또는 키메라 단백질을 발현하는 발현 벡터의 일부인 CVSP14 폴리펩티드-암호화 핵산을 포함한다. 특히, 상기 핵산은 CVSP14 폴리펩티드 암호화 영역에 작동적으로 연결된 프로모터를 가지며, 이러한 프로모터는 유도성 또는 구성성이고, 임의로 조직 특이적이다. 또 다른 특정한 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드 암호화 서열과 기타 모든 목적 서열이, 게놈 내의 목적하는 위 치에서 상동 재조합을 증진시키는 영역에 의해 플랭킹됨으로써 SP 단백질 핵산의 염색체내 발현을 제공해주는 핵산 분자가 사용된다[참조: Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)].

핵산을 환자에게 전달하는 것은 직접적으로 수행하거나(이러한 경우, 환자는 해당 핵산 또는 핵산-함유 벡터에 직접적으로 노출된다), 간접적으로 수행할 수 있다(이러한 경우, 세포를 먼저, 상기 핵산으로 시험관내에서 형질전환시킨 다음, 이를 환자에게 이식한다). 이들 2가지 접근법은 각각 생체내 또는 생체외 유전자 요법으로서 공지되어 있다.

특정 양태에서는, 핵산을 생체내에서 직접 투여하여, 이를 발현시켜 암호화된 생성물을 생성시킨다. 이는 당해 분야에 공지된 수 많은 방법, 예를 들면, 이를 적당한 핵산 발현 벡터의 일부로서 작제하고, 이를 투여하여, 예를 들어, 결함있는 또는 약독화 레트로바이러스성 또는 기타 바이러스성 벡터[미국 특허 제4,980,286호 참조]를 사용하여 감염시키거나 또는 노출된 DNA를 직접적으로 주사함으로써 세포내성이 되도록 하거나; 미세입자 충격을 이용하거나(예: 유전자 총; Biolistic, Dupont); 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질감염제로의 피복, 리포좀, 미세입자 또는 미세캡슐에서 포막형성시키거나, 이를 핵 내로 유입되는 것으로 공지된 펩티드에 결합합시켜 투여하거나, 이를 수용체 매개된 내식작용[참조: Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)](이는 상기 수용체를 특이적으로 발현하는 세포 유형을 표적시키는데 사용될 수 있다)이 수행된 리간드에 결합시켜 투 여함으로써 수행될 수 있다. 또 다른 양태에서는, 리간드가 엔도솜을 파쇄시키는 융합유도성(fusogenic) 바이러스성 펩티드인 핵산-리간드 복합체가 형성되어, 핵산이 라이소섬성 분해를 피할 수 있게 된다. 또 다른 양태에서는, 특이적 수용체를 표적화시킴으로써, 세포 특이적 흡수 및 발현에 대해 상기 핵산을 생체내에서 표적화시킬 수 있다[참조: PCT Publications WO 92/06180 dated April 16, 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 dated December 23, 1992 (Wilson et al.); WO92/20316 dated November 26, 1992 (Findeis et al.); WO93/14188 dated July 22, 1993 (Clarke et al.), WO 93/20221 dated October 14, 1993 (Young)]. 또 다른 한편, 핵산을 상동 재조합에 의해, 발현을 위해 숙주 세포 DNA 내에 세포내적으로 도입 및 혼입시킬 수 있다[참조: Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)].

특정 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드 핵산을 함유하는 바이러스성 벡터가 사용된다. 예를 들어, 레트로바이러스성 벡터가 사용될 수 있다[참조: Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)]. 이들 레트로바이러스성 벡터는 바이러스성 유전자의 포장 및 숙주 세포 DNA 내로의 통합에 불필요한 레트로바이러스성 서열을 결실시키도록 변형시켰다. 유전자 요법에 사용될 CVSP14 폴리펩티드 핵산을 벡터 내로 클로닝하여, 유전자가 환자에게 전달되는 것을 촉진시킨다. 레트로바이러스성 벡터에 관한 보다 상세한 설명은 다음 문헌을 참조할 수 있다[참조: Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)]. 이러한 문헌에는 화학요법에 보다 내성인 줄기 세포를 만들기 위해 mdr1 유전자를 조혈 줄기 세포에 전달시키는 레트 로바이러스성 벡터의 용도가 기재되어 있다. 유전자 요법에 있어서의 레트로바이러스성 벡터의 용도를 예시해주는 기타 참조문헌은 다음과 같다[Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); and Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)].

아데노바이러스는 유전자 요법에 사용될 수 있는 기타 바이러스성 벡터이다. 아데노바이러스는 유전자를 호흡 상피에 전달하는데 특히 관심을 끄는 비히클이다. 아데노바이러스는 본래 호흡 상피를 감염시켜, 경미한 질병을 유발시킨다. 아데노바이러스-이용된 전달 시스템에 대한 기타 표적은 간, 중추신경계, 내피 세포 및 근육이다. 아데노바이러스는 비-분열성 세포를 감염시킬 수 있다는 이점을 지니고 있다. 문헌[참조: Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993)]에는 아데노바이러스-이용된 유전자 요법에 관해 고찰되어 있다. 문헌[참조: Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)]에는 유전자를 붉은털 원숭이(rhesus monkey)의 호흡 상피에 전이시키기 위해 아데노바이러스 벡터를 사용하는 것이 기재되어 있다. 유전자 요법에서 아데노바이러스의 용도에 관한 기타 예가 다음에 제시되어 있다[참조: Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et

al., Cell 68:143-155 (1992); and Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993)].

아데노-관련 바이러스(AAV)가 또한 유전자 요법에 사용하는 것으로 제안된 바 있다[참조: Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993)].

유전자 요법에 대한 또 다른 접근법은 전기천공, 리포펙션, 인산칼슘 매개된 형질감염 또는 바이러스성 감염과 같은 방법에 의해 유전자를 조직 배양물 중의 세포에 전이시키는 것을 포함한다. 통상적으로, 이러한 전이 방법에는 선별성 마커를 상기 세포에 전이시키는 것이 포함된다. 이어서, 상기 세포를 전이된 유전자를 흡수 및 발현하는 세포를 분리시키도록 선별 하에 놓아둔다. 이어서, 상기 세포를 환자에게 전달한다.

상기 양태에서는, 핵산을 세포 내로 도입한 후, 생성되는 재조합 세포를 생체내 투여한다. 이러한 도입은 당해 분야에 공지된 모든 방법에 의해 수행될 수 있는데, 이에는 형질감염, 전기천공, 미세주사, 해당 핵산 서열을 함유하는 바이러스성 또는 박테리오파아지 벡터로의 감염, 세포 융합, 염색체 매개된 유전자 전이, 미세세포-매개된 유전자 전이, 원형질체 융합 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 외래 유전자를 세포 내로 도입하는 수 많은 기술이 당해 분야에 공지되어 있고[참조: Loeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92 (1985)], 이들은 수용자 세포의 필수적인 발생적 및 생리학적 기능이 파괴되지 않는 한 사용될 수 있다. 상기 기술은 핵산을 세포로 안정적으로 전이시킬 수 있어, 핵산은 상기 세포에 의해 발현될 수 있고, 이의 세포 후손에 의해서도 유전되어 발현될 수 있어야만 한다.

생성되는 재조합 세포는 당해 분야에 공지된 각종 방법에 의해 환자에게 전달될 수 있다. 한 양태에서는, 상피 세포를 예를 들어, 피하 주사한다. 또 다른 양태에서는, 재조합 피부 세포를 환자에 대한 피부 이식편으로서 적용할 수 있다. 재조합 혈액 세포(예: 조혈 줄기 또는 전구 세포)를 정맥내 투여할 수 있다. 사용되는 세포의 양은 목적하는 효과, 환자의 상태 등에 좌우되고, 이는 당업자에 의해 결정될 수 있다.

유전자 요법 목적상 핵산을 도입시킬 수 있는 세포에는 모든 바람직한 입수 가능한 세포 유형이 포괄되고, 이에는 상피 세포, 내피 세포, 각질세포, 섬유아세포, 근육 세포, 간세포; 혈액 세포, 예를 들면, T 림프구, B 림프구, 단구, 매크로파아지, 호중구, 호산구, 거핵세포, 과립구; 각종 줄기 또는 전구 세포, 특히 조혈 줄기 또는 전구 세포, 예를 들면, 골수, 제대혈, 말초혈, 태아 간 및 이의 기타 공급원으로부터 수득된 줄기 세포가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

예를 들어, 유전자 요법에 사용된 세포는 해당 환자에 대해 자가성이다. 재조합 세포가 유전자 요법에 사용되는 양태에서는, CVSP14 폴리펩티드 핵산을 세포내로 도입하여, 이것이 상기 세포 또는 이의 자손에 의해 발현될 수 있도록 한 다음, 재조합 세포를 치료학적 효과를 위해 생체내 투여한다. 특정 양태에서는, 줄기 또는 전구 세포를 사용한다. 시험관내에서 분리 및 유지될 수 있는 모든 줄기 및/또는 전구 세포를 상기 양태에 따라서 효율적으로 사용할 수 있다. 이러한 줄기 세포에는 조혈 줄기 세포(HSC), 상피 조직, 예를 들면, 피부 및 장기 내층, 배아 심장 근육 세포의 줄기 세포, 간 줄기 세포[참조: PCT Publication WO 94/08598, dated April 28, 1994)], 및 신경 줄기 세포[참조: Stemple and Anderson, Cell 71:973-985 (1992)]가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

상피 줄기 세포(ESC) 또는 각질 세포는 공지된 과정에 의해 피부 및 장기 내층과 같은 조직으로부터 수득할 수 있다[참조: Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980)]. 피부와 같은 층화된 상피 조직에서는, 기저 박층에 가장 근접한 층인 배아층 내에서 줄기 세포를 유사분열시킴으로써 재생이 일어난다. 장기 내층 내의 줄기 세포는 상기 조직을 신속하게 재생시켜 준다. 환자 또는 공여자의 피부 또는 장기 내층으로부터 수득된 ESC 또는 각질 세포를 조직 배양물에서 성장시킬 수 있다[참조: Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); Pittelkow and Scott, Cano Clinic Proc. 61:771 (1986)]. ESC가 공여자에 의해 제공된 경우에는, 숙주 대 그래프트 반응성을 억제시키는 방법(예를 들어, 적당한 면역억제를 증진시키기 위한 복사선, 약물 또는 항체 투여)을 사용할 수도 있다.

조혈 줄기 세포(HSC)와 관련하여, 시험관내에서 HSC의 분리, 증식 및 유지를 제공해주는 모든 기술을 상기 양태에 사용할 수 있다. 이를 수행할 수 있는 기술에는 (a) 미래의 숙주 또는 공여자로부터 분리된 골수 세포로부터 HSC 배양물을 분리 및 확립시키는 방법, 또는 (b) 동종유전자성 또는 이종유전자성일 수 있는, 미리 확립시킨 장기간 HSC 배양물을 사용하는 방법이 포함된다. 비-자가성 HSC는 일반적으로, 미래의 숙주/환자의 이식 면역 반응을 억제시키는 방법에 사용된다. 특정한 양태에서는, 사람 골수 세포를 바늘 흡인에 의해 후장골 능선으로부터 수득될 수 있다[참조: Kodo et al., J. Clin. Invest. 73:1377-1384 (1984)]. 예를 들어, HSCs는 고도로 풍부하거나 또는 실재적으로 정제된 형태로 만들 수 있다. 이러한 보강은 장기간 배양 전, 동안 또는 후에 수행될 수 있고, 당해 분야에 공지된 기술에 의해 수행될 수 있다. 골수 세포의 장기간 배양물은, 예를 들어, 변형된 덱스터 세포 배양 기술[참조: Dexter et al., J. Cell Physiol. 91:335 (1977)] 또는 위트록-위테(Witlock-Witte) 배양 기술[참조: Witlock and Witte, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3608-3612 (1982)]을 사용함으로써, 확립 및 유지시킬 수 있따.

특정 양태에서는, 유전자 요법의 목적상 투여될 핵산은 암호화 영역에 작동적으로 연결된 유도성 프로모터를 포함하므로, 이러한 핵산의 발현이 적당한 전사 유도인자의 존재 또는 부재를 제어함으로써 제어될 수 있다.

3. 프로드럭

종양을 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 CVSP14에 의해 특이적 부위에서 절단되어 활성 약물을 방출시키는 프로드럭을 투여함으로써 실시된다. CVSP14 활성을 발현하는 세포와의 접촉시, 프로드럭은 활성 약물로 전환된다. 프로드럭은 표적화된 CVSP14에 대한 기질에 연결된 활성제, 예를 들면, 항종양제, 예를 들어, 세포독성제, 기타 치료제(TA)를 함유하는 접합체일 수 있기 때문에, 상기 약물 또는 제제는 상기 접합체 중에서 세포에 불활성이거나 세포 내로 유입될 수 없지만, 절단시 활성화된다. 프로드럭은, 예를 들어, 표적화된 CVSP14에 의해 단백질분해적으로 절단되는 올리고펩티드, 전형적으로 비교적 짧은 약 10개 미만의 아미노산 펩티드인 올리고펩티드를 함유할 수 있다. 세포독성제에는 알킬화제, 항증식제, 및 투불린 결합 제제가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 기타에는 빈카(vinca) 약물, 미토마이신, 블레오마이신 및 탁산이 포함된다.

M. 동물 모델

형질전환된 동물 모델 및 동물, 예를 들면, 설치류(마우스 및 랫트 포함), 소, 닭, 돼지, 염소, 양, 고릴라 및 기타 영장류가 본원에 제공된다. 특히, CVSP14 폴리펩티드를 암호화하는 이종 핵산을 함유하는 형질전환된 비-사람 동물, 또는 예를 들어, 내인성 유전자의 프로모터 영역 또는 기타 조절성 영역을 대체 또는 변형시킴으로써 상기 폴리펩티드의 발현을 변화시킨 형질전환된 동물이 제공된다.

이러한 동물은 상동 또는 기타 재조합 사건을 통하여, 강력한 프로모터 하의 발현에 의해서와 같이 잘못-발현되거나 과발현될 수 있는 내인성 CVSP14 유전자 간의 재조합을 증진시킴으로써 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 형질전환된 동물은 벡터를 사용하거나 기타 유전자 전달 방식을 사용하여 핵산을 배선 세포, 예를 들면, 배아 줄기 세포 내로 도입함으로써 생성시킬 수 있다. 전형적으로, 핵산을 예를 들어, 배아성 줄기 세포 내로 도입한 다음, 배아-유래된 줄기(ES) 세포를 CVSP14 폴리펩티드-암호화 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환시킴으로써 주사한 후, 이러한 ES 세포를 포배낭 내로 주사하고, 이러한 포배낭을 양모(foster mother) 내로 이식한 다음, 형질전환된 동물을 탄생시킨다. 일반적으로, 동물의 염색체 내로의 도입은 이종 CVSP14-암호화 핵산과 내인성 핵산 간의 재조합에 의해 발생된다. 상기 이종 핵산은 특이적 염색체를 표적으로 할 수 있다. 몇몇 경우에는, 녹아웃(knockout) 동물이 생성될 수 있다. 이러한 동물은 생물학적으로 불활성이 된(전형적으로, 이종 서열, 예를 들어, 항생제 내성 유전자의 삽입에 의함) 외인성 CVSP14 폴리펩티드 유전자와 이의 염색체 내의 CVSP14 폴리펩티드 유전자 간의 상 동 재조합을 증진시킴으로써 초기에 생성시킬 수 있다. 한 양태에서, 상기 상동 재조합은 배아-유래된 줄기(ES) 세포를 삽입적으로 불활성화된 CVSP14 폴리펩티드 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환시켜 상동 재조합이 발생되도록 한 다음, 이러한 ES 세포를 포배낭 내로 주사하고, 이러한 포배낭을 양모 내로 이식한 다음, 키메라 동물('녹아웃 동물')[여기서, CVSP14 폴리펩티드 유전자는 불활성화되었다]을 탄생시킴으로써 수행된다[참조: Capecchi, Science 244:1288-1292 (1989)]. 이러한 키메라 동물은 동형접합성 녹아웃 동물을 생성하도록 탄생될 수 있으며, 이어서 이를 사용하여 부가의 녹아웃 동물을 생성시킬 수 있다.

녹아웃 동물에는 마우스, 햄스터, 양, 돼지, 소, 및 기타 비-사람 포유동물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 녹아웃 마우스가 생성된다. 상기 녹아웃 동물은 신생물성 질병이 발생되는 것으로 예측되거나 또는 이러한 질병이 발생되기 쉽기 때문에, 상기 질병이나 장애를 치료 또는 예방하는 능력에 대해 분자를 스크리닝 또는 시험하기 위해, 상기 질병의 동물 모델로서 사용될 수 있다. 상기 동물은 일반적으로 강력한 프로모터하의 발현에 의해 오발현되거나 과발현될 수 있는 외인성 CVSP14 폴리펩티드 유전자와 이의 염색체 중의 CVSP15 유전자 간의 상동 재조합을 증진시킴으로써 초기에 생성시킬 수 있다. 한 양태에서는, 상기 상동 재조합이 배아-유래된 줄기(ES) 세포를, 상기 과발현되거나 오발현된 CVSP14 폴리펩티드 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환시켜 상동 재조합이 발생되도록 한 다음, 이러한 ES 세포를 포배낭 내로 주사하고, 이러한 포배낭을 양모 내로 이식한 다음, 키메라 동물[여기서, CVSP14 유전자가 과발현되거나 잘못 발현되 었다]을 탄생시킴으로써 수행된다[참조: Capecchi, Science 244:1288-1292 (1989)]. 이러한 키메라 동물은 과발현되거나 오발현된 CVSP14 폴리펩티드를 지닌 부가의 동물을 생성하도록 탄생될 수 있다. 상기 동물에는 마우스, 햄스터, 양, 돼지, 소, 및 기타 비-사람 포유동물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서는, 과발현되거나 잘못 발현된 CVSP14 폴리펩티드를 지닌 마우스가 생성된다.

실시예

다음 실시예는 예시적이며, 이로써 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.

실시예 1

CVSP14의 도입

전립선 종양 샘플로부터 일본쇄 cDNA 제조

사람 전립선 종양 CWR22R을 누드 마우스 상에서 성장시킨다. CWR22R 조직을 절개하고, TRIZOL 시약(Gibco BRL)에 놓아두고, 제조업자의 지시에 따라서 총 RNA를 정제한다. 올리고텍스 mRNA 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 폴리 A $^{+}$ RNA를 총 RNA로부터 추가로 정제시킨다. 슈퍼스크립 제1-가닥 합성 시스템(Gibco BRL)을 사용하여 일본쇄 cDNA를 합성한다. 무작위 6량체 또는 올리고(dT)를 사용하여, 상기 제1-가닥 cDNA 합성을 개시한다.

축퇴성 프라이머 PCR에 의한 세린 프로테아제 프로필화

촉매적 히스티딘(DSPP1) 및 촉매적 세린(DSPP2)에 플랭킹된 컨센서스 서열로부터 고안된 축퇴성 프라이머를 사용하여, 세린 프로테아제 도메인을 증폭시킨다. 사용되는 센스 프라이머(DSPP1)의 서열은 다음과 같다(서열 7): 5'-TGG (GA)TI (ACG)TI (TA)(CG)I GCI (AG)CI CA(TC) TG-3' (괄호안의 뉴클레오티드는 등몰 혼합물을 나타내고, I는 데옥시이노신을 나타낸다). 사용된 안티센스 프라이머(DSPP2)의 서열은 다음과 같다(서열 8): 5'-IGG ICC ICC I(CG)(TA) (GA)TC ICC (TC)TI (AG)CA IG(TAC) (AG)TC-3'. 무작위 6량체 및 올리고(dT) 프라이밍된 cDNA를 PCR 반응에 대한 주형으로서 사용한다. PCR 생성물을 아가로즈 겔 상에서 분리시키고, 450 내지 550-bp의 모든 생성물을 상기 겔로부터 추출한 다음, pCR2.1-TOPO 클로닝 벡터(Invitrogen) 내로 아클로닝하였다. EcoR 1 분해 생성물을 아가로즈 겔 상에서 전기영동시켜, PCR-생성된 삽입물을 함유하는 플라스미드를 동정한다. 450 내지 550bp 삽입체를 함유하는 플라스미드를 대상으로 하여, DNA 서열분석하였다. 이들 클론 중의 하나가, 신규한 세린 프로테아제의 프로테아제 도메인의 일부분을 암호화하는 474bp 삽입체를 함유하였다. 이러한 세린 프로테아제 서열이 CVSP14로서 후술된다.

무작위 6량체 및 올리고(dT) 프라이밍된 cDNA를 PCR 반응에 대한 주형으로서 사용한다. PCR 생성물을 아가로즈 겔 상에서 분리시키고, 450 내지 550-bp의 모든 생성물을 상기 겔로부터 추출한 다음, pCR2.1-TOPO 클로닝 벡터(Invitrogen) 내로 아클로닝하였다. EcoR 1 분해 생성물을 아가로즈 겔 상에서 전기영동시킴으로써, PCR-생성된 삽입체를 함유하는 플라스미드를 동정하였다. 450 내지 550bp 삽입체 를 함유하는 플라스미드를 대상으로 하여, DNA 서열분석하였다. 이들 클론 중의 하나가, 세린 프로테아제의 프로테아제 도메인의 일부분을 암호화하는 474bp 삽입체를 함유하였고, 이것이 본원에서 CVSP14로서 지칭된다.

사람 게놈 데이터베이스 htgs(완성되지 않은 고 처리량 게놈 서열)에 대한 BLAST 조사 결과, 상기 서열이 사람 염색체 11로부터 유도되는 게놈 서열 AC012228에 부합되는 것으로 밝혀졌다.

CVSP14의 프로테아제 도메인을 암호화하는 cDNA의 클로닝

클론캡쳐 cDNA 선별용 키트(Clontech)를 사용하여, CVSP14 프로테아제 도메인을 암호화하는 cDNA를 수득한다. 바이오틴-21-dUTP의 존재하에 DSPP1 및 DSPP2 프라이머를 사용한 PCR에 의해 CVSP14에 대한 바이오티닐화 474bp 부분적 cDNA 클론을 생성시킨다. 이러한 바이오티닐화 생성물을 겔 정제하고, RecA-매개된 클론캡쳐 과정에서 프로브로서 사용한다. 사람 전립선 선암종 cDNA 라이브러리(Gibco BRL Cat. # 11597-010)를 cDNA 공급원으로서 사용한다. 포획된 cDNA를 전기천공에 의해 ElectroMAX DH10B 세포 내로 형질전환시키고, CVSP14 프로테아제 도메인을 함유하는 양성 클론을, 비-바이오티닐화 DSPP1 및 DSPP2 PCR 생성물을 사용하여 콜로니 하이브리드화함으로써 동정하였다. DNA 서열 분석함으로써 양성 클론을 확인하였다. 4개의 양성 클론을 DNA 서열 분석한 결과, 모든 클론이 세린 프로테아제의 프로테아제 도메인을 암호화하는 cDNA를 함유하고 있는 것으로 나타났다. CVSP14 프로테아제 도메인을 암호화하는 cDNA는 756bp로 구성되고, 이는 251개 아미노산으로 해독된다. 단백질 데이터베이스를 BLAST 분석한 결과, 상기 세린 프로테아제가 제노퍼스 오비덕틴(Xenopus oviductin)(Genbank 수탁번호 U81291)의 세린 프로테아제 도메인 중의 하나와 가장 높은 상동성을 나타내었는데, 동일성은 47%이었다.

사람 CVSP14 완전한 길이의 cDNA의 클로닝

CVSP14의 나머지 5' 상부 cDNA를 수득하기 위해, GeneRacer 키트(Ambion, Cat. No. L1500-01)를 사용하여 합성된 사람 신장 5'-RACE cDNA 상에서 5'-RACE cDNA 반응을 수행하였다. GeneRacer 키트는 5' 및 3' cDNA 말단의, 완전한 길이의 RNA 리가제-매개된 신속한 증폭을 위해 특수하게 고안된 것이다(RLM-RACE). 제1의 5'-RACE 반응은 GeneRacer 5' 프라이머를 유전자 특이적 프라이머, GX-SP1-4AS, 5'-GTTAAGCGGCCCCAGCCTGCAGTTGTAC-3' (서열)와 함께 사용한 PCR에 의해 수행하였다. PCR 생성물을 아가로즈 겔 상에서 정제하였다.

제2의 네스티드 PCR은 GeneRacer 5' 네스티드 프라이머를 GX-SP1-1AS, 5'- GCTCTCCTGGGTCTGTCTGGCTTAAGTC-3' (서열 19)(제1 5'-RACE 생성물을 주형으로서 사용함)와 함께 사용하여 수행하였다. 500bp를 초과하는, RACE 반응으로부터의 PCR 생성물을 아가로즈 겔 상에서 정제하고, pCR2.1-TOPO 클로닝 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA) 내로 아클로닝하였다. 이어서, 콜로니 하이브리드화를 수행하여, CVSP14 서열을 함유하는 양성 콜로니를 동정하였다. AAAACT **ATG** AGT (서열 20) 내에 ATG 출발 코돈을 포함하는 제2의 5'-RACE 생성물로부터 279 bp의 부가 서열을 수득하였다.

CVSP14의 뉴클레오티드 및 단백질 서열

사람 CVSP14의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 다음에 제시되고 서열 12 및 13에 제시된다:

```
         GAT TCA CCA CGT CTT GGT TAA TGA ATA AAC TTG TTT TAA ATT GGC TTA TTG CTG

GTC TCT CAA GGC TTC CTA TTT TTG TTT GCT TTA GTC TCT CTA AAA TTT CAG GGA AAA ACT
115/1                                     145/11
ATG AGT CTC AAA ATG CTT ATA AGC AGG AAC AAG CTG ATT TTA CTA CTA GGA ATA GTC TTT
M   S   L   K   M   L   I   S   R   N   K   L   I   L   L   L   G   I   V   F
175/21                                    205/31
TTT GAA CAA GGT AAA TCT GCA GCT CTT TCG CTC CCC AAA GCT CCC AGT TGT GGG CAG AGT
F   E   Q   G   K   S   A   A   L   S   L   P   K   A   P   S   C   G   Q   S
235/41                                    265/51
CTG GTT AAG GTA CAG CCT TGG AAT TAT TTT AAC ATT TTC AGT CGC ATT CTT GGA GGA AGC
L   V   K   V   Q   P   W   N   Y   F   N   I   F   S   R   I   L   G   G   S
295/61                                    325/71
CAA GTG GAG AAG GGT TCC TAT CCC TGG CAG GTA TCT CTG AAA CAA AGG CAG AAG CAT ATT
Q   V   E   K   G   S   Y   P   W   Q   V   S   L   K   Q   R   Q   K   H   I
355/81                                    385/91
TGT GGA GGA AGC ATC GTC TCA CCA CAG TGG GTG ATC ACG GCG GCT CAC TGC ATT GCA AAC


C   G   G   S   I   V   S   P   Q   W   V   I   T   A   A   H   C   I   A   N
415/101                                   445/111
AGA AAC ATT GTG TCT ACT TTG AAT GTT ACT GCT GGA GAG TAT GAC TTA AGC CAG ACA GAC
R   N   I   V   S   T   L   N   V   T   A   G   E   Y   D   L   S   Q   T   D
475/121                                   505/131
CCA GGA GAG CAA ACT CTC ACT ATT GAA ACT GTC ATC ATA CAT CCA CAT TTC TCC ACC AAG
P   G   E   Q   T   L   T   I   E   T   V   I   I   H   P   H   F   S   T   K
535/141                                   565/151
AAA CCA ATG GAC TAT GAT ATT GCC CTT TTG AAG ATG GCT GGA GCC TTC CAA TTT GGC CAC
K   P   M   D   Y   D   I   A   L   L   K   M   A   G   A   F   Q   F   G   H
595/161                                   625/171
TTT GTG GGG CCC ATA TGT CTT CCA GAG CTG CGG GAG CAA TTT GAG GCT GGT TTT ATT TGT
F   V   G   P   I   C   L   P   E   L   R   E   Q   F   E   A   G   F   I   C
655/181                                   685/191
ACA ACT GCA GGC TGG GGC CGC TTA ACT GAA GGT GGC GTC CTC TCA CAA GTC TTG CAG GAA
T   T   A   G   W   G   R   L   T   E   G   G   V   L   S   Q   V   L   Q   E
715/201                                   745/211
GTG AAT CTG CCT ATT TTG ACC TGG GAA GAG TGT GTG GCA GCT CTG TTA ACA CTA AAG AGG
V   N   L   P   I   L   T   W   E   E   C   V   A   A   L   L   T   L   K   R
775/221                                   805/231
CCC ATC AGT GGG AAG ACC TTT CTT TGC ACA GGT TTT CCT GAT GGA GGG AGA GAC GCA TGT
P   I   S   G   K   T   F   L   C   T   G   F   P   D   G   G   R   D   A   C
835/241                                   865/251
CAG GGA GAT TCA GGA GGT TCA CTC ATG TGC CGG AAT AAG AAA GGG GCC TGG ACT CTG GCT
Q   G   D   S   G   G   S   L   M   C   R   N   K   K   G   A   W   T   L   A
895/261                                   925/271
GGT GTG ACT TCC TGG GGT TTG GGC TGT GGT CGA GGC TGG AGA AAC AAT GTG AGG AAA AGT
G   V   T   S   W   G   L   G   C   G   R   G   W   R   N   N   V   R   K   S
955/281                                   985/291
GAT CAA GGA TCC CCT GGG ATC TTC ACA GAC ATT AGT AAA GTG CTT TCC TGG ATC CAC GAA
D   Q   G   S   P   G   I   F   T   D   I   S   K   V   L   S   W   I   H   E
1015/301                                  1045/311
CAC ATC CAA ACT GGT AAC TAA
H   I   Q   T   G   N   *
```

* 밑줄은 시그날 펩티드를 나타낸다.

CVSP14의 서열 분석 및 도메인 구성

CVSP14 DNA 및 단백질 서열은 DNA 스트라이더(버젼 1.2)를 사용하여 분석하였다. CVSP14의 ORF는 921bp로 구성되는데, 이는 306개 아미노산으로 해독된다. http://smart.embl-heidelberg.de에서 SMART(Simple Modular Architecture Research Tool) 프로그램을 사용한 단백질 서열 분석 결과는, CVSP14가 N-말단에 시그날 펩티드(아미노산 1번 내지 25번)를 갖고, 이어서 티로신-유사 세린 프로테아제 도메인(아미노산 55-306)을 갖는 분비된 세린 프로테아제라는 것을 지시해준다. 이의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열이 서열 12 및 13에 제시되어 있다.

정상 및 종양 조직에서의 CVSP14의 유전자 발현 프로필

CVSP14 전사체의 유전자 발현 프로필에 관한 정보를 수득하기 위해, CVSP14-특이적 프라이머 GX-SP1-1 (서열 9) (5'-GACTTAAGCCAGACAGACCCAGGAGAGC-3') 및 GX-SP1-2AS (5'-TTGTGAGAGGACGCCACCTTCAGTTAAGC-3') (서열 10)을 사용하여, 몇 가지 사람 성인 조직(Clontech, Cat. #K1420-1), 태아 조직(Cat. #K1425-1) 및 1차 종양(사람 종양 다중 조직 cDNA 패널, 카탈로그 번호 K1522-1, CLONTECH)으로부터 만든 cDNA 패널상에서 PCR 분석을 수행하였다.

35회의 PCR 주기 후, CVSP14의 고발현을 지시해주는 강력한 세기의 DNA 밴드(246bp)가 신장 cDNA에서만 검출되었다. 적당한 세기의 DNA 밴드가 폐 cDNA에서 관찰되었고, 약한 밴드는 태반 cDNA에서 관찰되었다. 태아 조직 또는 종양 cDNA에서는 검출가능한 어떠한 시그날도 관찰되지 않았다. 40회의 PCR 주기 후, 부가의 시그날이 성인 간, 췌장, 태아 심장, 태아 폐, 태아 골격근, 태아 흉선, 결장 선암종(CX-1), 및 췌장성 선암종 (GI-103)에서 검출될 수

있다.

DSPP1 및 DSPP2 프라이머에 의해 발생된 474bp의 PCR 생성물을 사용하여, 68개의 사람 종양 및 동일한 개개인으로부터의 상응하는 정상 조직(카탈로그 번호 7840-1 사람 일치된 종양/정상 발현 어레이; CLONTECH)으로부터 합성된 cDNA로 구성된 cDNA 블롯 뿐만 아니라 72개의 상이한 사람 조직(사람 다중 조직 발현 (MTE) 어레이; Clontech, Palo Alto, CA; catalog no. 7776-1)으로부터 추출된 RNA로 구성된 도트 블롯을 프로빙한다. CVSP14의 고발현을 지시해주는 강력한 시그날이 15개의 정상 신장 cDNA 샘플 중의 6개에서 검출되었고, 중간정도 또는 약한 시그날은 8개의 부가의 정상 신장 cDNA 샘플에서 검출되었다. CVSP14 시그날은 일치된 신장 종양 샘플 모두에서 감소되었다. 전립선 정상/종양 cDNA 샘플 3쌍 모두에서 약한 시그날이 검출되었다. 또한, 9개의 정상 유방 샘플 중의 3개에서 약한 시그날이 검출되었다. 7개의 자궁 종양 중의 1개에서 약한 시그날이 또한 검출되었지만, 이들의 정상 조직 대응물에서는 검출되지 않았다. 3개의 정상 폐 조직 샘플 중의 2개에서 약한 시그날이 또한 검출되었지만, 이들의 일치된 종양 샘플에서는 검출되지 않았다. 극히 약한 시그날이 HeLa 세포, 부르키트 림프종 다우디 세포, 만성 골수구 백혈병 K562, 전골수구 백혈병 HL-60 세포, 흑색종 G361 세포, 폐 암종 A549 세포, 림프아구성 백혈병 MOLT-4 및 결장직장 선암종 SW480 세포를 포함한 각종 종양 세포주로부터의 cDNA 샘플에서 관찰될 수 있다.

MTE 분석 결과는 CVSP14 전사체가 림프절에서 적당한 수준으로 발현되고 심장, 위, 십이지장, 공장, 회장, 일로세큠(ilocecum), 결장(상행, 횡단, 및 하행), 신장, 골격근, 폐, 태반, 간, 췌장 및 타액선에서 약하게 발현된다는 것을 지시해주었다.

실시예 2

프로테아제 CVSP14 도메인의 발현

CVSP14 및 이의 프로테아제 도메인 각각을 암호화하는 핵산을 피치아 파스토리스(Pichia pastoris) 벡터 pPIC9K(공급원: Invitrogen; 서열 11 참조)의 유도체 내로 클로닝할 수 있다. 플라스미드 pPIC9K 특징은 1-948에 5' AOX1 프로모터 단편; 855-875에 5' AOX1 프라이머 부위; 949-1218에 알파-인자 분비 시그날(들); 1152-1172에 알파-인자 프라이머 부위; 1192-1241에 다중 클로닝 부위; 1327-1347에 3' AOX1 프라이머 부위; 1253-1586에 3' AOX1 전사 종결 영역; 4514-1980에 HIS4 ORF; 5743-4928에 가나마이신 내성 유전자; 6122-6879에 3' AOX1 단편; 7961-7288에 ColE1 기점; 및 8966-8106에 앰피실린 내성 유전자를 포함한다. 상기 플라스미드는 가나마이신 내성 유전자 내의 XhoI 부위를 제거함으로써 pPIC9K로부터 유래된 것이며, 생성된 벡터는 본원에서 pPIC9Kx로 명명된다.

CVSP14의 프로테아제 도메인의 C122S 돌연변이유발

CVSP14의 프로테아제 도메인을 암호화하는 유전자를 PCR SOE(중복 신장에 의한 PCR-이용된 스플라이싱)에 의해 돌연변이유발시켜, 위치 122에서의 짝을 이루지 않은 시스테인(키모트립신 넘버링 시스템; CVSP14 서열 13 중의 시스테인 166)을 세린으로 대체시킨다. 각각 위치 166에서 세린에 대한 AGT 코돈을 함유하는 2개의 중복 유전자 단편을 다음 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시킨다: 5' 유전자 단편에 대해서는, TCTCTCGAGAAAAGAATTCTTGGAGGAAGCCAAGTGGAG (서열 14) 및 TTTGTGGGGCCCATA A GT CTTCCAGAGCTGCGG (서열 15)를 사용하고; 3' 유전자 단편에 대해 서는, ATTCGCGGCCGCTTAGTT-ACCAGTTTGGATGTGTTCGTG (서열 16) 및 CCGCAGCTCTGGAAG AC T TATGGGCCCCACAAA (서열 17)을 사용한다. 상기 증폭된 유전자 단편을 1% 아가로즈 겔 상에서 정제하고; 혼합한 다음, PCR에 의해 재증폭시켜, CVSP14 C122S(Cys $_{166}$ 서열 13; Cys $_{111}$ 서열 6)의 프로테아제 도메인에 대한 완전한 길이의 암호화 서열을 생성시킨다. 이어서, 상기 서열을 제한 효소 NotI 및 XhoI로 절단시키고, 벡터 pPic9KX 내로 연결시킨다.

CVSP14 발현 벡터의 작제

C122S 점 돌연변이를 함유하는 CVSP14(즉, CVSP14C122S, 서열 12 및 13 중의 위치 C $_{166}$)를 암호화하는 cDNA를 pPIC9Kx:CVSP14C122S로부터 클로닝하였따. 프라이머 CVSP14-5' GGAATTCCATATGAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAAATTCTTGGAGGAAGCCAAGTGGAG (NdeI 제한 부위를 함유함; 서열 21) 및 CVSP14-3' CCGCTCGAGGTTACCAGTTTGGATGTGTTCGTGG (XhoI 제한 부위를 함유함; 서열 22)를 사용하여, 지모겐 활성화에 대한 엔테로키나제 인식 서열(DDDDK)을 활용하여 사람 CVSP14 프로테아제 도메인을 PCR 증폭시킨다. 증폭은 20mM 트리스-HCl (25℃에서 pH 8.75), 10mM KCl, 10mM $(NH_4)_2SO_4$, 2mM $MgSO_4$, 0.1% 트리톤 X-100, 0.1mg/ml BSA, 0.2mM dNTPs, 1.0 단위 ACCUZYME DNA 폴리머라제(Bioline USA, Inc., New Jersey), 및 100 pmol의 프라이머를 함유하는 총 용적 50㎕에서 수행한다. 반응 혼합물을 95℃로 5분 동안 가열한 다음, 95, 60 및 75℃에서 각각 30초 동안 25주기 수행하고 75℃에서 2분 동안 최종적으로 신장시킨 다.

PCR 생성물을 QIAquick PCR 정제용 키트(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)를 사용하여 정제시킨다. PCR 생성물을

37°C에서 2시간 동안 10단위 NdeI 및 10단위 XhoI로 이중으로 분해시킨다. 이와 같이 분해된 단편을 1.4% 아가로즈 겔 상에서 정제하고, 에티듐 브로마이드로 염색시킨다. CVSP14 cDNA를 함유하는 밴드를 절단하고, QIAEX II 겔 추출용 키트(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)를 사용하여 정제한다. 이어서, CVSP14 cDNA를 표준 방법을 사용하여 pET21b 발현 벡터(Novagen, Inc., Madison, WI)의 NdeI 및 XhoI 부위 내로 클로닝시킨다. 이 벡터는 고정화된 금속 친화 크로마토그래피(IMAC)에 의한 정제를 위해 C-말단 6xHIS 태그의 융합을 허용해준다. 수용능 XL10 세포(Stratagene)를 pET21bCVSP14 벡터로 형질전환시키고, 이를 사용하여 플라스미드 스톡을 생성시킨다. 적당한 삽입과 DNA 서열은 형광성 열 염료 DNA 서열분석 방법 뿐만 아니라 제한 절단에 의해 확인하였다.

단백질 발현, 정제 및 재폴딩

희귀한 코돈 최적화를 위해 dnaY 플라스미드를 함유하는 이. 콜라이 균주 BL21(DE3)에서 해당 유전자 생성물의 과발현을 달성하였다[참조: Garcia et. al. (1986) Cell 45:453-459; see, U.S. Patent No. 6,270,988]. 카르바니실린(50μg/ml) 및 가나마이신(34μg/ml)을 보충시킨 2xYT 배지(1L)을 10ml 밤새 배양물과 함께 접종하고, 0.6 내지 1.0 OD600 밀도로 성장시킨 후, 1M IPTG(1mM 최종 농도)로 유도시켰다. 유도 성장시킨지 6시간 후, 세포를 원심분리(3000g x 20분)함으로써 수거하였다.

세포 펠릿을 5 내지 10mg 라이소자임 및 1U DNasel을 보충시킨, 50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 5% LADO, pH 7.4(25ml)에 재현탁시켜 세포를 용해시키고 DNA를 전단시킨다. 생성된 용액을 48,000g에서 20분 동안 원심분리시킨다. 상등액을 경사 제거하고, 봉입체 펠릿을 용해 완충액으로 균질화시킴으로써 세척한 다음, 용해 완충액 마이너스 세정제로 균질화시킴으로써 세척하는데, 이때 두 세척물 간을 상기 언급된 바와 같이 원심분리시킨다. 이어서, 상기 봉입체 펠릿을 25ml 6M GuHCl, 20mM 트리스-HCl, 300mM NaCl, 20mM βMe, pH 8.0에 용해시킨다. 이어서, 상기 용액을 48,000g에서 30분 동안 원심분리시켜 미립형 물질을 제거한다.

생성된 용액을 0.2㎛ 주사기 필터 내로 여과시킨 후, 6M GuHCl, 20mM 트리스-HCl, 300mM NaCl, pH 8.0으로 예비-평형시킨 25ml Ni-NTA 수지(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) 상에 부하한다. 이 칼럼을 2 칼럼 용적 평형 완충액으로 세척한 다음, 3 칼럼 용적 8M 우레아, 20mM 트리스-HCl, 300mM NaCl, pH 8.0으로 세척한다. 이어서, 정제된 봉입체를 2 칼럼 용적 8M 우레아, 20mM 트리스-HCl, 300mM NaCl, 1M 이미다졸, pH 8.0으로 용출시킨다.

연동식 펌프를 사용하여 상기 봉입체 혼합물을 8L 100mM 트리스-HCl, 150mM NaCl, 7.5mM 시스테인, 1mM 시스틴, 0.5M 아르기닌, 3g/L 콜산, pH 8.0에 서서히 가함으로써, CVSP14를 재폴딩시킨다. 이러한 재폴딩 혼합물을 4°C에서 7일 동안 교반시키거나 티올 농도가 엘만 시약에 의해 검출된 바와 같이 1mM 이하로 될 때까지 교반시킨다. 재폴딩 용액을 1μM 필터 내로 여과시키고, 한외여과시킴으로써 농축시키며, 완충액을 PBS, 3g/L 콜산, pH 8.0에서 교환하였다.

1 내지 10U/ml EKMax(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 부가하고, 반응이 완료될 때까지(일반적으로 4 내지 8일) 4°C에서 항온처리함으로써, CVSP14의 활성화를 수행하였다. 상기 용액을, 글리코실화 엔테로키나제와 결합하는 소량의 ConA 수지로 처리함으로써 잔류성 EKMax를 제거한다. EKMax의 완전한 제거는 특이적 엔테로키나제 융합유도성 기질에 대한 해당 용액의 활성을 측정함으로써 확인하였다.

생성된 용액을 대상으로 하여, 일련의 프로테아제 기질에 대한 활성에 대해 스크리닝하였다: spec-tPa, spec-PL, spec-fXIIa (American Diagnostica), S-2239, S-2266 (Kabi Diagnostica), S-2586, S-2366, S-2444, S-2288, S-2251, S-2302, S-2765, S-2222, spec-TH (Chromogenix), 및 spec-fVIIa (Pentapharm). CVSP14는 수 많은 이들 기지에 대해 몇몇 활성을 나타냈지만, S-2366(DiaPharm, Westchester, OH)에 대해 가장 활성적이었다.

실시예 3

CVSP의 활성을 조절하는 후보 화합물을 동정하기 위한 검정

억제제를 동정하기 위한 검정

CVSP14의 촉매적 활성 억제제로서 작용하는 시험 화합물의 능력은 아미도분해적 검정으로 평가할 수 있다. 재조합 CVSP14 또는 이의 프로테아제 도메인 부분에 의한 아미도분해 활성의 억제제-유래된 억제는 상기 검정에서 IC_{50} 값에 의해 측 정할 수 있다.

상기 언급된 바와 같이 발현된 CVSP14의 프로테아제 도메인을 대상으로 하여, 다음과 같이 각종 시험 화합물에 의한 억제를 알아보기 위해 코스타르 96 웰 조직 배양판(Corning NY)에서 검정한다. 대략 1 내지 10nM 프로테아제를 억제제의 부재하에, 또는 10,000nM 억제제 및 7개의 1:6 희석물의 존재하에, 1X 직접 완충액(29.2mM 트리스, pH 8.4, 29.2mM 이미다졸, 217mM NaCl(100μℓ 최종 용적)) 내로 가하고, 실온에서 30분 동안 항온처리한다. 400μM 기질

S 2366 (L-피로글루타밀-L-프롤릴-L-아르기닌-p-니트로아닐린, 하이드로클로라이드; DiaPharma, Westchester, OH)를 가하고, 반응을 SpectraMAX Plus 미세판 판독기((Molecular Devices, Sunnyvale CA)에서 모니터한 다음, 37°C에서 20분 동안 405nm의 흡광도 하의 변화를 모니터하였다.

기질의 동정

본 검정에 사용하기 위한 특정한 검정은 기질을 시험함으로써 실험적으로 동정할 수 있다. 다음 기질 목록이 시험될 수 있는 것의 예이다:

기질 명칭	구조
S 2366	피로Glu-Pro-Arg-pNA.HCl
스펙트로자임 t-PA	CH_3SO_2-D-HHT-Gly-Arg-pNA.AcOH
N-p-토실-Gly-Pro-Arg-pNA	N-p-토실-Gly-Pro-Arg-pNA
벤조일-Val-Gly-Arg-pNA	벤조일-Val-Gly-Arg-pNA
퍼파크롬 t-PA	CH_3SO_2-D-HHT-Gly-Arg-pNA
S 2765	N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl
S 2444	피로Glu-Gly-Arg-pNA.HCl
S 2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.HCl
스펙트로자임 UK	Cbo-L-(γ)Glu(α-t-BuO)-Gly-Arg-pNA.2AcOH
S 2302	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl
S 2266	H-D-Val-Leu-Arg-pNA.2HCl
S 2222	Bz-Ile-Glu(g-OR)-Gly-Arg-pNA.HCl (R = H(50%) 및 R = CH_3 (50%)
크로모자임 PK	벤조일-Pro-Phe-Arg-pNA
S 2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl
S 2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA.2HCl
스펙트로자임 PI	H-D-Nle-HHT-Lys-pNA.2HCl
	Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC
	H-Arg-Gln-Arg-Arg-AMC
	Boc-Gln-Gly-Arg-AMC
	Z-Arg-Arg-AMC
스펙트로자임 THE	H-D-HHT-Ala-Arg-pNA.2AcOH
스펙트로자임 fXIIa	H-D-CHT-Gly-Arg-pNA.2AcOH
	CVS 2081-6($MeSO_2$-dPhe-Pro-Arg-pNA)
	페파크롬 fVIIa(CH_3SO_2-D-CHA-But-Arg-pNA)
pNA = 파라-니트라닐라이드 (발색성) AMC = 아미노 메틸 쿠마린 (형광성)	

상기 기질 중의 어떠한 것도 절단되지 않는다면, 상기 언급된 커플 검정을 사용할 수 있다. 간략하게 설명하면, 효소, 예를 들면, 플라스미노겐 및 트립시노겐을 활성화시키는 프로테아제의 능력을 시험한다. 이들 검정을 수행하기 위해, 일본쇄 프로테아제를 공지된 기질, 예를 들면, 지모겐에 대한 lys-플라스미노겐의 존재하에, 지모겐, 예를 들면, 플라스미노겐 또는 트립시노겐과 함께 항온처리한다. 이러한 일본쇄가 상기 지모겐을 활성화시키면, 이와 같이 활성화된 효소, 예를 들면, 플라스민 및 트립신이 이에 대한 기질을 분해시킬 것이다.

실시예 4

기타 검정

이들 검정은 MTSP1를 참조로 하여 기재되었지만, 이러한 검정은 CVSP14와 함께 사용하도록 용이하게 변용시킬 수 있다.

매트립타제 또는 MTSP1의 세린 프로테아제 활성의 억제를 결정하기 위한 아미도분해적 검정

rMAP 촉매적 활성 억제제로서 작용하는 시험 화합물의 능력은 IC_{50} 값에 의해 측정된 바와 같이, MAP에 의한 아미도분해 활성의 억제제-유래된 억제를 결정함으로써 평가한다. 검정용 완충액은 HBSA(10mM Hepes, 150mM 염화나트륨, pH 7.4, 0.1% 소 혈청 알부민)이다. 모든 시약은 달리 언급되지 않는 한 다음 공급원(Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)으로부터 입수한 것이다.

(a) 30분 또는 60분에서의 검정(시험 화합물과 효소를 30분 또는 60분 동안 예비 항온처리함) 및 (b) 0분에서의 검정(시험 화합물과 효소를 전혀 예비 항온처리하지 않음)인 2가지 IC_{50} 검정을 수행한다. 30분 또는 60분에서의 IC_{50} 검정인 경우에는, 다음 시약, 즉 50마이크로리터의 HBSA, HBSA(또는 억제되지 않은 속도 측정을 위해 HBSA 단독)에 희석된(광범위한 농도 범위를 포괄한다) 50마이크로리터의 시험 화합물, 및 완충액에 희석된 50마이크로리터의 rMAP(Corvas International)을 코닝 미세역가 플레이트의 적당한 웰에서 합하면, 활성 부위 여과에 의해 결정된 바와 같이 최종 효소 농도 250pM이 생성된다. 주위 온도에서 30분 또는 60분 항온 처리를 수행한 후, 50마이크로리터의 기질 S-2765(N-α-벤질옥시카보닐-D-아르기닐-L-글리실-L-아르기닌-p-니트로아닐린 디하이드로클로라이드; DiaPharma Group, Inc.; Franklin, OH)를 각 웰에 부가함으로써 상기 검정을 개시시키면, 200마이크로리터의 최종 검정 용적과 100μM의 최종 기질 농도(약 4배 K_m)가 생성된다. 검정 혼합물에 부가하기 전에, S-2765를 탈이온수에서 재구성시키고 HBSA에 희석시킨다. 0분에서의 IC_{50} 검정의 경우에는, 동일한 시약을 합한다: 50마이크로리터의 HBSA, HBSA(또는 억제되지 않은 속도 측정을 위해 HBSA 단독)에 희석된(동일한 농도 범위를 포괄한다) 50마이크로리터의 시험 화합물, 및 50마이크로리터의 기질 S-2765. 상기 검정은 50마이크로리터의 rMAP를 부가함으로써 개시시킨다. 모든 성분의 최종 농도는 양 IC_{50} 검정(30 또는 60분, 및 0분에서의 검정)에서 동일하였다.

발색성 기질 가수분해의 초기 속도는, 5분에 걸쳐 Thermo Max Kinetic 미세판 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 405nM에서의 흡광도 변화에 의해 양 검정에서 측정하였는데, 여기서는 부가된 기질의 5% 미만이 사용되었다. 초기 가수분해율을 50% 감소시키는, 부가된 억제제의 농도가 상기 두 검정(30 또는 60분, 및 0분에서의 검정) 각각에서 각각의 IC_{50} 값으로서 정의되었다.

특이성 결정을 위한 시험관내 효소 검정

매트립타제 활성의 선택적인 억제제로서 작용하는 화합물의 능력은, 상기 실 시예에 기재된 바와 같이, 매트립타제의 활성을 50% 억제시키는 시험 화합물의 농도(IC_{50})를 결정하고, 매트립타제에 대한 IC_{50} 값을, 다음의 세린 프로테아제의 전부 또는 몇몇에 대해 결정된 값을 비교함으로써 평가하였다: 트롬빈, 재조합 조직 플라스미노겐 활성화제(rt-PA), 플라스민, 활성화된 단백질 C, 키모트립신, 인자 Xa 및 트립신.

모든 검정에 사용된 완충액은 HBSA(10mM HEPES, pH 7.5, 150mM 염화나트륨, pH 7.4, 0.1% 소 혈청 알부민)이다.

IC_{50} 를 결정하기 위한 검정은 50마이크로리터의 HBSA, HBSA(또는 V_0 (억제되지 않은 속도) 측정을 위해 HBSA 단독)에 희석된 특정 농도(광범위한 농도 범위를 포괄한다) 하의 50마이크로리터의 시험 화합물, 및 HBSA에 희석된 50마이크로리터의 상기 효소를 코닝 미세역가 플레이트의 적당한 웰에서 합함으로써 수행하였다. 주위 온도에서 30분 항온처리를 수행한 후, 다음에 구체화된 농도 하의 50마이크로리터의 기질을 상기 웰에 가하면, 200마이크로리터의 최종 총 용적이 생성된다. 발색성 기질 가수분해의 초기 속도는, 5분에 걸쳐 Thermo Max Kinetic 미세판 판독기를 사용하여 405nM에서의 흡광도 변화에 의해 측정하였는데, 여기서는 부가된 기질의 5% 미만이 사용되었다. 초기 가수분해율을 50% 감소시키는, 부가된 억제제의 농도가 IC_{50} 값으로서 정의되었다.

트롬빈(flla) 검정

발색성 기질인 페파크롬(Pefachrome) t-PA(CH_3SO_2-D-헥사하이드로티로신-글리실-L-아르기닌-p-니트로아닐린; 공급원: Pentapharm Ltd.)를 사용하여, 효소 활성을 결정하였다. 이 기질은 사용하기 전에 탈이온수에서 재구성한다. 정제된 사람 α-트롬빈은 공급원(Enzyme Research Laboratories, Inc.)으로부터 수득하였다. 모든 검정에 사용된 완충액은 HBSA(10mM HEPES, pH 7.5, 150mM 염화나트륨, pH 7.4, 0.1% 소 혈청 알부민)이다.

IC_{50} 결정은 HBSA(50μℓ), α-트롬빈(50μℓ)(최종 효소 농도는 0.5nM이다) 및 억제제(50μℓ)(광범위한 농도 범위를 포괄한다)를 적당한 웰에서 합하고, 실온에서 30분 동안 항온처리한 후, 기질 페파크롬-t-PA(50μℓ)(최종 기질 농도

는 250μM, 약 5배 Km이다)을 부가한다. 페파크롬-t-PA 가수분해의 초기 속도는, 5분에 걸쳐 Thermo Max Kinetic 미세판 판독기를 사용하여 405nM에서의 흡광도 변화에 의해 측정하였는데, 여기서는 부가된 기질의 5% 미만이 사용되었다. 초기 가수분해율을 50% 감소시키는, 부가된 억제제의 농도가 IC_{50} 값으로서 정의되었다.

인자 Xa

발색성 기질 S-2765 (N-α-벤질옥시카보닐-D-아르기닐-L-글리실-L-아르기닌-p-니트로아닐린 디하이드로클로라이드; 공급원: DiaPharma Group, Inc.; Franklin, OH)을 사용하여, 인자 Xa 촉매적 활성을 결정하였다. 모든 기질은 사용하기 전에 탈이온수에서 재구성시켰다. S-2765의 최종 농도는 250μM(약 5배 Km)이다. 정제된 사람 인자 X는 공급원(Enzyme Research Laboratories, Inc.; South Bend, IN)으 로부터 수득하였고, 인자 Xa(FXa)는 문헌[참조: Bock, P.E., Craig, P.A., Olson, S.T., and Singh, P. Arch. Biochem. Biophys. 273:375-388 (1989)]에 기재된 바와 같이 활성화 및 제조하였다. 상기 효소를 검정에 앞서 HBSA 내로 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 0.25nM이다.

재조합 조직 플라스미노겐 활성화제(rt-PA) 검정

기질 페파크롬 t-PA (CH_3SO_2-D-헥사하이드로티로신-글리실-L-아르기닌-p-니트로아닐린; 공급원: Pentapharm Ltd.)를 사용하여, rt-PA 촉매적 활성을 결정하였다. 상기 기질을 탈이온수에서 구성한 다음, 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 500마이크로몰(약 3배 Km)이다. 사람 rt-PA(Activase)는 공급원(Genentech Inc.)으로부터 수득하였다. 이 효소를 탈이온수에서 재구성시키고, 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 1.0nM이다.

플라스민 검정

발색성 기질 S-2366 (L-피로글루타밀-L-프롤릴-L-아르기닌-p-니트로아닐린, 하이드로클로라이드; 공급원: DiaPharma, Westchester, OH)을 사용하여, 플라스민 촉매적 활성을 결정하였다. 상기 기질을 탈이온수에서 구성한 다음, 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 300마이크로몰(약 2.5배 Km)이다. 정제된 사람 플라스민은 공급원(Enzyme Research Laboratories, Inc.)으로부터 수득하였다. 이 효소를 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 1.0nM이다.

활성화된 단백질 C(aPC) 검정

발색성 기질 페파크롬 PC (델타-카보벤질옥시-D-리신-L-프롤릴-L-아르기닌-p-니트로아닐린, 디하이드로클로라이드; 공급원: Pentapharm Ltd.)을 사용하여, aPC 촉매적 활성을 결정하였다. 상기 기질을 탈이온수에서 구성한 다음, 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 400마이크로몰(약 3배 Km)이다. 정제된 사람 aPC은 공급원(Hematologic Technologies, Inc.)으로부터 수득하였다. 이 효소를 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 1.0nM이다.

키모트립신 검정

발색성 기질 S-2586 (메톡시-석시닐-L-아르기닌-L-프롤릴-L-티로실-p-니트로아닐리드; 공급원: DiaPharma Group)을 사용하여, 키모트립신 촉매적 활성을 결정하였다. 상기 기질을 탈이온수에서 구성한 다음, 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 100마이크로몰(약 9배 Km)이다. 정제된(3X-결정화됨; CDI) 소 췌장성 알파-키모트립신은 공급원(Washington Biochemical Corp.)으로부터 수득하였다. 이 효소를 탈이온수에서 재구성시키고, 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 0.5nM이다.

트립신 검정

발색성 기질 S-2222 (벤조일-L-이소루이신-L-글루탐산-[감마-메틸 에스테르]-L-아르기닌-p-니트로아닐리드; 공급원: DiaPharma Group)을 사용하여, 트립신 촉매적 활성을 결정하였다. 상기 기질을 탈이온수에서 구성한 다음, 검정에 앞서 HBSA에 희석시켰으며, 이의 최종 농도는 250마이크로몰(약 4배 Km)이다. 정제된(3X-결정화됨; TRL3) 소 췌장성 트립신은 공급원(Washington Biochemical Corp.)으로부터 수득하였다. 이 효소를 탈이온수에서 재구성시키고, 검정에 앞서 HBSA에 희석시키는데, 여기서 최종 농도는 0.5nM이다.

각종 변형이 당업자에게는 명백할 것이기 때문에, 본 발명은 첨부된 청구의 범위에 의해서만 제한된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
서열 13의 완전한 서열을 포함하지 않고 세린 프로테아제 14(CVSP14) 부분이 필수적으로 CVSP14의 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분으로 이루어지는, CVSP14의 프로테아제 도메인, 또는 이의 촉매적 활성 부분 또는 이의 도메인을 포함하는 실질적으로 정제된 일본쇄 또는 이본쇄 폴리펩티드.

청구항 2.
제1항에 있어서, 서열 6의 아미노산 서열 또는 이의 촉매적 활성 부분을 포함하는 정제된 폴리펩티드.

청구항 3.
실질적으로 정제된 활성화 이본쇄 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 촉매적 활성 부분.

청구항 4.
제3항에 있어서,

서열 5 또는 12의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열;

서열 6 또는 13의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 5 또는 12의 뉴클레오티드 서열에 높은 엄격성 조건하에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 6 또는 13의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 6 또는 13의 아미노산 서열과 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및

서열 12의 서열의 스플라이스 변이체인 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드로 이루어진 그룹 중에서 선택된 폴리펩티드를 포함하는, 실질적으로 정제된 활성화 이본쇄 CVSP14 폴리펩티드.

청구항 5.
제1항에 따르는 폴리펩티드와 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는 실질적으로 정제된 폴리펩티드.

청구항 6.
제1항에 있어서, 필수적으로 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분으로 이루어진 폴리펩티드.

청구항 7.
제1항에 따르는 폴리펩티드와 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성을 나타내고 제1항에 따르는 폴리펩티드와 동일한 기질 상에서 촉매 활성의 10% 이상을 보유하는 실질적으로 정제된 폴리펩티드.

청구항 8.
제1항에 있어서, 사람 폴리펩티드인 실질적으로 정제된 폴리펩티드.

청구항 9.
제1항에 있어서, 서열 6의 아미노산 서열 또는 이의 촉매적 활성 부분을 포함하거나, 또는

(a) 서열 5의 뉴클레오티드 서열;

(b) 중간정도 또는 높은 엄격성 조건하에, (a)에 의해 암호화된 CVSP14를 암호화하는 포유동물 세포 내에 존재하는 mRNA 전사체에 상보적인 핵산과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열;

(c) (a)의 스플라이스 변이체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및

(d) (a) 또는 (b)의 뉴클레오티드 서열의 축퇴성 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드.

청구항 10.
제1항에 있어서,

(a) 서열 5 또는 12의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 프로테아제 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열;

(b) 중간정도 또는 높은 엄격성 조건하에, (a)에 의해 암호화된 CVSP14를 암호화하는 포유동물 세포 내에 존재하는 mRNA 전사체에 상보적인 핵산과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열;

(c) (a) 또는 (b)의 스플라이스 변이체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및

(d) (a) 또는 (b)의 뉴클레오티드 서열의 축퇴성 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 실질적으로 정제된 일본쇄 또는 이본쇄 폴리펩티드.

청구항 11.
제1항에 있어서, 프로테아제 도메인 부분이, 높은 엄격성 조건하에 이의 완 전한 길이의 약 70% 이상을 따라, 서열 5의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자와 하이브리드화되는 핵산 분자에 의해 암호화되는, 실질적으로 정제된 폴리펩티드.

청구항 12.
제1항에 있어서, 프로테아제 도메인 부분이, 높은 엄격성 조건하에 이의 완전한 길이의 70% 이상을 따라, 서열 15의 뉴클레오티드 서열 또는 이의 하나 이상의 도메인 또는 상기 도메인의 촉매적 활성 부분을 포함하는 핵산 분자와 하이브리드화되는 핵산 분자에 의해 암호화되는 폴리펩티드.

청구항 13.
아미노산의 약 50% 이하가 또 다른 아미노산으로 대체되고 생성된 폴리펩티드가 돌연변이되지 않은 폴리펩티드의 10% 이상의 촉매적 활성을 갖는 일본쇄 또는 이본쇄 폴리펩티드인, 제1항에 따르는 폴리펩티드의 뮤테인인 폴리펩티드.

청구항 14.
제13항에 있어서, 아미노산의 약 10% 이하가 또 다른 아미노산으로 대체되는 폴리펩티드.

청구항 15.
제13항에 있어서, 생성되는 폴리펩티드가 일본쇄 또는 이본쇄 폴리펩티드이고 돌연변이되지 않은 폴리펩티드의 50% 이상의 촉매적 활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 16.
제13항에 있어서, 프로테아제 도메인 내의 유리 시스테인이 또 다른 아미노 산으로 대체되는 폴리펩티드.

청구항 17.
제13항에 있어서, 아미노산의 약 95% 이하가 보존되거나 또는 보존적 아미노산 치환체로 대체되는 폴리펩티드.

청구항 18.
제13항에 있어서, 대체되는 아미노산이 세린인 폴리펩티드.

청구항 19.
아미노산의 약 50% 이하가 또 다른 아미노산으로 대체되고 생성되는 폴리펩티드가 일본쇄 또는 이본쇄 폴리펩티드이고 돌연변이되지 않은 폴리펩티드의 10% 이상의 촉매적 활성을 갖는, 제3항에 따르는 폴리펩티드의 뮤테인인 폴리펩티드.

청구항 20.
제19항에 있어서, 아미노산의 약 10% 이하가 또 다른 아미노산으로 대체되는 폴리펩티드.

청구항 21.
제19항에 있어서, 생성되는 폴리펩티드가 이본쇄 폴리펩티드이고 돌연변이되지 않은 폴리펩티드의 50% 이상의 촉매적 활성을 갖는 폴리펩티드.

청구항 22.
제19항에 있어서, 프로테아제 도메인 내의 유리 Cys가 또 다른 아미노산으로 대체되어, 생성되는 폴리펩티드가 단백질분해 활성을 나타내는 폴리펩티드.

청구항 23.
제22항에 있어서, 프로테아제 도메인 내의 유리 Cys가 세린으로 대체되는 폴리펩티드.

청구항 24.
제1항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 25.
제3항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 26.
제6항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 27.
제3항에 있어서, 필수적으로 프로테아제 도메인으로 이루어지는 폴리펩티드.

청구항 28.
제24항에 있어서,

(a) 서열 5 또는 12의 뉴클레오티드 서열;

(b) 높은 엄격성 조건하에 이의 완전한 길이의 약 70% 이상을 따라, 서열 5 또는 12의 뉴클레오티드 서열과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열; 및

(c) (a) 또는 (b)의 축퇴성 코돈으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 29.
제13항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 30.
제24항에 따르는 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 31.
제30항에 있어서, 발현 벡터인 벡터.

청구항 32.
제30항에 있어서, 진핵성 벡터인 벡터.

청구항 33.
제31항에 있어서, 이에 작동적으로 연결된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 모든 폴리펩티드의 분비를 지시하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터.

청구항 34.
제30항에 있어서, 피치아(Pichia) 벡터, 포유동물 벡터 또는 이. 콜라이 벡터인 벡터.

청구항 35.
제30항에 따르는 벡터를 포함하는 세포.

청구항 36.
제35항에 있어서, 원핵 세포인 세포.

청구항 37.
제35항에 있어서, 진핵 세포인 세포.

청구항 38.
제35항에 있어서, 세균 세포, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 및 동물 세포 중에서 선택되는 세포.

청구항 39.
제35항에 있어서, 포유동물 세포인 세포.

청구항 40.
제6항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 41.
제40항에 따르는 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 42.
제41항에 따르는 벡터를 포함하는 세포.

청구항 43.
제3항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 내인성 유전자를, 해당 동물 또는 이의 자손의 상동 재조합 또는 삽입 돌연변이유발에 의해 결실 또는 불활성화시킨 재조합 비-사람 동물.

청구항 44.
제35항에 따르는 세포를, 암호화된 폴리펩티드가 당해 세포에 의해 발현되도록 하는 조건하에 배양하는 단계; 및

발현된 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하여, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 도메인을 함유하는 폴리펩티드를 생성시키는 방법.

청구항 45.
제44항에 있어서, 폴리펩티드가 배양 배지 내로 분비되는 방법.

청구항 46.
제44항에 있어서, 폴리펩티드가 숙주 세포의 세포질에서 발현되는 방법.

청구항 47.
제42항에 따르는 세포를 암호화된 폴리펩티드가 당해 세포에 의해 발현되도록 하는 조건하에 배양하는 단계 및

발현된 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하여, 폴리펩티드의 프로테아제 도메인을 함유하는 폴리펩티드를 생성시키는 방법.

청구항 48.
제47항에 있어서, 폴리펩티드가 봉입체에서 발현되고, 폴리펩티드가 단백질분해적 활성 형태로 재폴딩되는 조건하에 이러한 폴리펩티드를 상기 봉입체로부터 분리시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 49.
제1항에 따르는 CVSP14의 프로테아제 도메인을 암호화하는 연속되는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 14개 이상의 연속되는 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하거나,

제1항에 따르는 CVSP14의 프로테아제 도메인을 암호화하는 연속되는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 16개 이상의 연속되는 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하거나,

제1항에 따르는 CVSP14의 프로테아제 도메인을 암호화하는 연속되는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 30개 이상의 연속되는 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 핵산 분자.

청구항 50.
제49항에 있어서, 서열 5 또는 12의 연속되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 분자.

청구항 51.
제1항에 따르는 CVSP14를 암호화하는 뉴클레오티드 서열로부터의 약 21개 이상의 연속되는 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 이본쇄 RNA(dsRNA) 분자.

청구항 52.

제1항에 따르는 폴리펩티드의 프로테아제 도메인의 일본쇄 형태 및/또는 이본쇄 형태와 특이적으로 결합하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 또는 이의 결합 도메인을 함유하는 상기 항체의 단편 또는 유도체.

청구항 53.
제52항에 있어서, 폴리펩티드의 효소적 활성을 억제시키는 항체.

청구항 54.
제1항에 따르는 폴리펩티드의 프로테아제 도메인의 일본쇄 형태에 특이적으로 결합하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 또는 이의 결합 도메인을 함유하는 상기 항체의 단편 또는 유도체.

청구항 55.
제3항에 따르는 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 또는 이의 결합 도메인을 함유하는 상기 항체의 단편 또는 유도체.

청구항 56.
a) 제1항에 따르는 폴리펩티드 및

b) 상기 폴리펩티드에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된 표적화제를 포함하는 접합체.

청구항 57.
제56항에 있어서, 표적화제가

i) 접합체의 친화적 분리 또는 정제;

ii) 접합체의 표면에 대한 부착;

iii) 접합체의 검출 또는

iv) 선택된 조직 또는 세포로의 표적화된 전달을 가능케하는 접합체.

청구항 58.
a) 제3항에 따르는 폴리펩티드 및

b) 상기 폴리펩티드에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된 표적화제를 포함하는 접합체.

청구항 59.
제58항에 있어서, 표적화제가

i) 접합체의 친화적 분리 또는 정제;

ii) 접합체의 특정 표면에 대한 부착;

iii) 접합체의 검출 또는

iv) 선택된 조직 또는 세포로의 표적화된 전달을 가능케하는 접합체.

청구항 60.
a) 제6항에 따르는 폴리펩티드 및

b) 상기 폴리펩티드에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결된 표적화제

를 포함하는 접합체.

청구항 61.
제60항에 있어서, 표적화제가

i) 접합체의 친화적 분리 또는 정제;

ii) 접합체의 특정 표면에 대한 부착;

iii) 접합체의 검출 또는

iv) 선택된 조직 또는 세포로의 표적화된 전달을 가능케하는 접합체.

청구항 62.
a) 제1항에 따르는 폴리펩티드의 촉매적 활성을 억제시키는 제제 또는 치료제 및

b) 항종양 및 항-혈관형성 치료제 및 항종제 및 항-혈관형성제 중에서 선택된 또 다른 치료제 또는 제제를 포함하는 조합물.

청구항 63.
제62항에 있어서, 억제제와 항종양제 및/또는 항-혈관형성제를 단일 약제학 적 조성물로 제형화시키거나 또는 각각을 별개의 약제학적 조성물로 제형화시킨 조합물.

청구항 64.
제62항에 있어서, 억제제가 항체 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 이본쇄 RNA(dsRNA) 중에서 선택되는 조합물.

청구항 65.
직접적으로 또는 링커를 통하여 이에 연결된, 제1항에 따르는 2개 이상의 폴리펩티드를 포함하는 고체 지지체.

청구항 66.
제65항에 있어서, 폴리펩티드가 어레이(array)를 포함하는 지지체.

청구항 67.
제65항에 있어서, 폴리펩티드가 다수의 상이한 프로테아제 도메인을 포함하는 지지체.

청구항 68.
직접적으로 또는 링커를 통하여 이에 연결된, 제24항에 따르는 핵산 분자 2개 이상 또는 16개 이상의 뉴클레오티드를 함유하는 이의 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 고체 지지체.

청구항 69.
제68항에 있어서, 핵산 분자가 어레이를 포함하는 지지체.

청구항 70.
제68항에 있어서, 핵산 분자가 상이한 프로테아제 도메인을 암호화하는 다수의 분자를 포함하는 지지체.

청구항 71.
CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 촉매적 활성 부분을, 이러한 폴리펩티드에 의해 단백질분해적으로 절단되는 기질과 접촉시키고, 이와 동시에, 또는 전 또는 후에, 단일 또는 다수의 시험 화합물을 가하는 단계,

시험 화합물의 존재하에 절단된 기질의 양을 측정하는 단계 및

대조군과 비교해서 절단된 기질의 양을 변화시키는 화합물을 선별함으로써, 상기 폴리펩티드의 활성을 조절하는 화합물을 동정하는 단계를 포함하여, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 활성을 조절하는 화합물을 동정하는 방법.

청구항 72.
제71항에 있어서, 시험 화합물이 폴리펩티드의 활성을 조절하는, 작은 분자, 펩티드, 펩티드-모사체, 천연 생성물, 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 73.
제71항에 있어서, 다수의 시험 물질이 동시에 스크리닝되는 방법.

청구항 74.
제71항에 있어서, 폴리펩티드가 필수적으로,

(a) 서열 5의 뉴클레오티드 서열;

(b) 높은 엄격성 조건하에, (a)에 의해 암호화된 CVSP14를 암호화하는 포유동물 세포내에 존재하는 mRNA 전사체에 상보적인 핵산과 하이브리드화되는 뉴클레 오티드 서열;

(c) (a) 또는 (b)의 스플라이스 변이체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및

(d) (a), (b) 또는 (c)의 뉴클레오티드 서열의 축퇴성 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드로 이루어지는 방법.

청구항 75.
제71항에 있어서, 폴리펩티드가 필수적으로,

서열 5의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 12의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 5 또는 12의 뉴클레오티드 서열에 높은 엄격성 조건하에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 6의 아미노산으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드;

서열 6 또는 13의 아미노산 서열과 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드; 및

서열 13의 서열의 스플라이스 변이체인 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드로 이루어진 그룹 중에서 선택된 폴리펩티드로 이루어지는 방법.

청구항 76.
제71항에 있어서, 절단된 기질 양의 변화가, 시험 화합물의 존재하에 절단된 기질의 양을 시험 화합물의 부재하에 절단된 기질의 양과 비교함으로써 평가되는 방법.

청구항 77.
제73항에 있어서, 다수의 폴리펩티드가 고체 지지체에 직접적으로 또는 링커를 통하여 연결되는 방법.

청구항 78.
제73항에 있어서, 폴리펩티드가 어레이를 포함하는 방법.

청구항 79.
CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 단백질분해적 활성 부분을 단일 또는 다수의 시험 화합물과, 이의 결합을 수행하도록 해주는 조건하에 접촉시키는 단계; 및

a) 상기 폴리펩티드의 일본쇄 또는 이본쇄 형태, 또는 이의 단일 또는 이본쇄 형태 또는 이의 단일 또는 이본쇄 형태의 단백질분해적 활성 부분과 특이적으로 결합하는 시험 화합물을 동정하는 단계, 또는

b) 상기 폴리펩티드의 일본쇄 또는 이본쇄 형태, 또는 이의 단일 또는 이본쇄 형태 또는 이의 단일 또는 이본쇄 형태의 단백질분해적 활성 부분과 결합하는 것으로 공지된 화합물의 결합을 억제시키는 시험 화합물을 동정하는 단계(여기서, 공지된 화합물은 시험 화합물과 접촉시키기 전에, 동시에 또는 후에, 상기 폴리펩티드와 접촉시킨다)를 포함하여, CVSP14 폴리펩티드의 일본쇄 및/또는 이본쇄 프로테아제 도메인 및/또는 단일 또는 이본쇄 폴리펩티드 및/또는 이의 단일 또는 이본쇄 형태의 단백질분해적 활성 부분과 특이적으로 결합하는 화합물을 동정하는 방 법.

청구항 80.
제79항에 있어서, 폴리펩티드가 직접적으로 또는 링커를 통하여 고체 지지체에 간접적으로 연결되는 방법.

청구항 81.
제79항에 있어서, 시험 화합물이 작은 분자, 펩티드, 펩티드-모사체, 천연 생성물, 항체 또는 이의 단편인 방법.

청구항 82.
제79항에 있어서, 다수의 시험 물질이 동시에 스크리닝되는 방법.

청구항 83.
제79항에 있어서, 다수의 폴리펩티드가 고체 지지체에 연결되는 방법.

청구항 84.
제79항에 있어서, 폴리펩티드가 필수적으로,

(a) 서열 5의 뉴클레오티드 서열;

(b) 중간정도 또는 높은 엄격성 조건하에, (a)에 의해 암호화된 CVSP14를 암호화하는 포유동물 세포 내에 존재하는 mRNA 전사체에 상보적인 핵산과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열;

(c) (a) 또는 (b)의 스플라이스 변이체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열; 및

(d) (a), (b) 또는 (c)의 뉴클레오티드 서열의 축퇴성 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 그룹 중에서 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 폴리펩티드로 이루어지는 방법.

청구항 85.
지모겐 형태의 CVSP14 폴리펩티드 또는 이의 단백질분해적 활성 부분을, 상기 폴리펩티드의 활성화 형태의 기질과 접촉시키는 단계;

시험 화합물을, 상기 기질의 부가 전에, 후에 또는 이와 동시에 부가하는 단계; 및

기질의 절단을 검출함으로써, 지모겐을 활성화하는 화합물을 동정하는 단계를 포함하여, CVSP14의 지모겐 형태의 활성화제를 동정하는 방법.

청구항 86.
제85항에 있어서, 기질이 발색성 기질인 방법.

청구항 87.
제86항에 있어서, 기질이 L-피로글루타밀-L-프롤릴-L-아르기닌-p-니트로아닐린 하이드로클로라이드인 방법.

청구항 88.
제85항에 있어서, 시험 화합물이 작은 분자, 핵산 또는 폴리펩티드인 방법.

청구항 89.
제85항에 있어서, 폴리펩티드가 서열 13의 완전한 서열을 포함하지 않고, 상기 폴리펩티드의 CVSP14 부분이 필수적으로, CVSP14의 프로테아제 도메인 또는 이의 촉매적 활성 부분으로 이루어지는 방법.

청구항 90.
제1항에 따르는 폴리펩티드의 단백질분해 활성 억제제의 유효량을 포유동물에게 투여함을 포함하여, 상기 포유동물에서 신생물성 질병을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 91.
제90항에 있어서, 억제제가 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체, 또는 이의 결합 도메인을 함유하는 상기 항체의 단편 또는 유도체이고, 상기 항체가 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체인 방법.

청구항 92.
제3항에 따르는 폴리펩티드의 억제제의 유효량을 포유동물에게 투여함을 포함하여, 상기 포유동물에서 신생물성 질병을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 93.
CVSP14 폴리펩티드의 지모겐 형태 또는 이의 단백질분해적 활성 부분의 활성화를 억제시키거나 또는 CVSP14의 활성화 형태 또는 이의 단백질분해적 활성 부분의 활성을 억제시키는 제제를 투여함을 포함하여, 종양 개시, 성장 또는 진행을 억제시키거나, 또는 악성 질환 또는 전암성 질환을 치료하는 방법.

청구항 94.
제93항에 있어서, 질환이 유방, 자궁경부, 전립선, 폐, 난소 또는 결장 질환인 방법.

청구항 95.
제93항에 있어서, 제제가 안티센스 올리고뉴클레오티드, 이본쇄 RNA(dsRNA) 또는 항체인 방법.

청구항 96.
제93항에 있어서, 항종양 및 항-혈관형성 치료제 또는 항종양제 및 항-혈관형성제 중에서 선택된 또 다른 치료물 또는 제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 97.
시험 화합물을 CVSP14 폴리펩티드의 일본쇄 및 이본쇄 형태 둘 다와 접촉시키는 단계;

화합물이 결합되는 형태를 결정하는 단계; 및

특정 형태의 폴리펩티드과 결합하는 경우에는, 상기 화합물이 i) 상기 폴리펩티드의 일본쇄 지모겐 형태의 활성화를 억제시키는 특성; ii) 이본쇄 또는 일본쇄 형태의 활성을 억제시키는 특성 및 iii) 상기 폴리펩티드의 이량체화를 억제시키는 특성 중의 한 가지 이상을 나타내는지를 추가로 결정하는 단계를 포함하여, CVSP14 폴리펩티드의 일본쇄 또는 이본쇄 형태, 또는 CVSP14 폴리펩티드의 일본쇄 또는 이본쇄 형태의 단백질분해적 활성 부분과 결합하는 화합물을 동정하는 방법.

청구항 98.
생물학적 샘플 중에서, 검출되는 양이 신생물성 질병에 걸리지 않은 피험자에서의 양과 상이한, 제1항에 따르는 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 검출함을 포함하는, 신생물성 질병을 검출하는 방법.

청구항 99.
제98항에 있어서, 생물학적 샘플이 혈액, 뇨, 타액, 눈물, 활액, 땀, 매트릭스액, 뇌척수액, 복수, 종양 조직 생검 및 순환성 종양 세포로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 100.
피검자로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계; 및

이를, CVSP14 폴리펩티드의 이본쇄 형태 및/또는 일본쇄 형태와 결합하는 검출 가능한 제제에 노출시키는 단계를 포함하여, 피검자에게서 전암성 병변, 악성 종양, 또는 이본쇄 또는 일본쇄 형태의 존재 또는 부재를 특징으로 하는 기타 병리학적 질환의 존재를 진단하는 방법.

청구항 101.
체 조직 또는 체액 샘플 중의 CVSP14 폴리펩티드 수준을 정량화 및/또는 검출함을 포함하여, 종양 진행 및/또는 치료학적 효능을 모니터하는 방법.

청구항 102.
제101항에 있어서, 종양이 유방, 자궁경부, 전립선, 폐, 난소 또는 결장 종양인 방법.

청구항 103.
제101항에 있어서, 체액이 혈액, 뇨, 땀, 타액, 뇌척수액 및 활액인 방법.

청구항 104.
제1항에 따르는 폴리펩티드 또는 이의 촉매적 활성 부분을, 이러한 폴리펩티드에 의해 단백질분해적으로 절단되는 기질과 접촉시키고, 이와 동시에, 또는 전 또는 후에, 단일 또는 다수의 시험 화합물을 가하는 단계;

시험 화합물의 존재하에 절단된 기질의 양을 측정하는 단계; 및

대조군과 비교해서 절단된 기질의 양을 변화시키는 화합물을 선별함으로써, 상기 폴리펩티드의 활성을 조절하는 화합물을 동정하는 단계를 포함하여, CVSP14 폴리펩티드의 프로테아제 활성을 조절하는 화합물을 동정하는 방법.

청구항 105.
제3항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 이종 핵산을 포함하는, 형질전환된 비-사람 동물.

청구항 106.
서열 13의 아미노산 1번 내지 25번으로 필수적으로 이루어진, CVSP14 폴리펩티드의 일부분을 포함하는 폴리펩티드.

청구항 107.
제106항에 따르는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자.

<110> Corvas International, Inc.

<120> Nucleic acid molecules encoding serine protease CVSP14,
the encoded polypeptides and methods based thereon

<130> 5-1998-079941-6

<140> US 60/278,166

<141> 2001-03-22

<160> 22

<170> KopatentIn 1.7

<210> 1

<211> 3147

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<220>

<221> CDS

<222> (23)...(2589)

<223> Nucleotide sequence encoding MTSP1

<300>

<301> O'Brien, T.J. and Tanimoto, H.

<307> - -

<308> GenBank #AR081724

<309> 2000-08-31

<310> 5,972,616

<311> 1998-02-20

<312> 1999-10-26

<400> 1

tcaagagcgg cctcggggta cc atg ggg agc gat cgg gcc cgc aag ggc gga 52
Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly
1 5 10

ggg ggc ccg aag gac ttc ggc gcg gga ctc aag tac aac tcc cgg cac 100
Gly Gly Pro Lys Asp Phe Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His

```
                15                  20                  25
gag aaa gtg aat ggc ttg gag gaa ggc gtg gag ttc ctg cca gtc aac      148
Glu Lys Val Asn Gly Leu Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn
            30                  35                  40
aac gtc aag aag gtg gaa aag cat ggc ccg ggg cgc tgg gtg gtg ctg      196
Asn Val Lys Lys Val Glu Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu
        45                  50                  55
gca gcc gtg ctg atc ggc ctc ctc ttg gtc ttg ctg ggg atc ggc ttc      244
Ala Ala Val Leu Ile Gly Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe
    60                  65                  70
ctg gtg tgg cat ttg cag tac cgg gac gtg cgt gtc cag aag gtc ttc      292
Leu Val Trp His Leu Gln Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe
75                  80                  85                  90
aat ggc tac atg agg atc aca aat gag aat ttt gtg gat gcc tac gag      340
Asn Gly Tyr Met Arg Ile Thr Asn Glu Asn Phe Val Asp Ala Tyr Glu
                95                  100                 105
aac tcc aac tcc act gag ttt gta agc ctg gcc agc aag gtg aag gac      388
Asn Ser Asn Ser Thr Glu Phe Val Ser Leu Ala Ser Lys Val Lys Asp
            110                 115                 120
gcg ctg aag ctg ctg tac agc gga gtc cca ttc ctg ggc ccc tac cac      436
Ala Leu Lys Leu Leu Tyr Ser Gly Val Pro Phe Leu Gly Pro Tyr His
        125                 130                 135
aag gag tcg gct gtg acg gcc ttc agc gag ggc agc gtc atc gcc tac      484
Lys Glu Ser Ala Val Thr Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr
    140                 145                 150
tac tgg tct gag ttc agc atc ccg cag cac ctg gtg gag gag gcc gag      532
Tyr Trp Ser Glu Phe Ser Ile Pro Gln His Leu Val Glu Glu Ala Glu
155                 160                 165                 170
cgc gtc atg gcc gag gag cgc gta gtc atg ctg ccc ccg cgg gcg cgc      580
Arg Val Met Ala Glu Glu Arg Val Val Met Leu Pro Pro Arg Ala Arg
                175                 180                 185
tcc ctg aag tcc ttt gtg gtc acc tca gtg gtg gct ttc ccc acg gac      628
Ser Leu Lys Ser Phe Val Val Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Thr Asp
            190                 195                 200
```

```
tcc aaa aca gta cag agg acc cag gac aac agc tgc agc ttt ggc ctg      676
Ser Lys Thr Val Gln Arg Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Gly Leu
        205                 210                 215
cac gcc cgc ggt gtg gag ctg atg cgc ttc acc acg ccc ggc ttc cct      724
His Ala Arg Gly Val Glu Leu Met Arg Phe Thr Thr Pro Gly Phe Pro
    220                 225                 230
gac agc ccc tac ccc gct cat gcc cgc tgc cag tgg gcc ctg cgg ggg      772
Asp Ser Pro Tyr Pro Ala His Ala Arg Cys Gln Trp Ala Leu Arg Gly
235                 240                 245                 250
gac gcc gac tca gtg ctg agc ctc acc ttc cgc agc ttt gac ctt gcg      820
Asp Ala Asp Ser Val Leu Ser Leu Thr Phe Arg Ser Phe Asp Leu Ala
                255                 260                 265
tcc tgc gac gag cgc ggc agc gac ctg gtg acg gtg tac aac acc ctg      868
Ser Cys Asp Glu Arg Gly Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asn Thr Leu
            270                 275                 280
agc ccc atg gag ccc cac gcc ctg gtg cag ttg tgt ggc acc tac cct      916
Ser Pro Met Glu Pro His Ala Leu Val Gln Leu Cys Gly Thr Tyr Pro
        285                 290                 295
ccc tcc tac aac ctg acc ttc cac tcc tcc cag aac gtc ctg ctc atc      964
Pro Ser Tyr Asn Leu Thr Phe His Ser Ser Gln Asn Val Leu Leu Ile
    300                 305                 310
aca ctg ata acc aac act gag cgg cgg cat ccc ggc ttt gag gcc acc     1012
Thr Leu Ile Thr Asn Thr Glu Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr
315                 320                 325                 330
ttc ttc cag ctg cct agg atg agc agc tgt gga ggc cgc tta cgt aaa     1060
Phe Phe Gln Leu Pro Arg Met Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys
                335                 340                 345
gcc cag ggg aca ttc aac agc ccc tac tac cca ggc cac tac cca ccc     1108
Ala Gln Gly Thr Phe Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro
            350                 355                 360
aac att gac tgc aca tgg aac att gag gtg ccc aac aac cag cat gtg     1156
Asn Ile Asp Cys Thr Trp Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val
        365                 370                 375
aag gtg agc ttc aaa ttc ttc tac ctg ctg gag ccc ggc gtg cct gcg     1204
```

```
Lys Val Ser Phe Lys Phe Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala
    380                 385                 390
ggc acc tgc ccc aag gac tac gtg gag atc aat ggg gag aaa tac tgc     1252
Gly Thr Cys Pro Lys Asp Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys
395                 400                 405                 410
gga gag agg tcc cag ttc gtc gtc acc agc aac agc aac aag atc aca     1300
Gly Glu Arg Ser Gln Phe Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr
                415                 420                 425
gtt cgc ttc cac tca gat cag tcc tac acc gac acc ggc ttc tta gct     1348
Val Arg Phe His Ser Asp Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala
            430                 435                 440
gaa tac ctc tcc tac gac tcc agt gac cca tgc ccg ggg cag ttc acg     1396
Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr
        445                 450                 455
tgc cgc acg ggg cgg tgt atc cgg aag gag ctg cgc tgt gat ggc tgg     1444
Cys Arg Thr Gly Arg Cys Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp
    460                 465                 470
gcc gac tgc acc gac cac agc gat gag ctc aac tgc agt tgc gac gcc     1492
Ala Asp Cys Thr Asp His Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala
475                 480                 485                 490
ggc cac cag ttc acg tgc aag aac aag ttc tgc aag ccc ctc ttc tgg     1540
Gly His Gln Phe Thr Cys Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp
                495                 500                 505
gtc tgc gac agt gtg aac gac tgc gga gac aac agc gac gag cag ggg     1588
Val Cys Asp Ser Val Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly
            510                 515                 520
tgc agt tgt ccg gcc cag acc ttc agg tgt tcc aat ggg aag tgc ctc     1636
Cys Ser Cys Pro Ala Gln Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu
        525                 530                 535
tcg aaa agc cag cag tgc aat ggg aag gac gac tgt ggg gac ggg tcc     1684
Ser Lys Ser Gln Gln Cys Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser
    540                 545                 550
gac gag gcc tcc tgc ccc aag gtg aac gtc gtc act tgt acc aaa cac     1732
Asp Glu Ala Ser Cys Pro Lys Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His
```

```
555                 560                 565                 570

acc tac cgc tgc ctc aat ggg ctc tgc ttg agc aag ggc aac cct gag     1780
Thr Tyr Arg Cys Leu Asn Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu
                575                 580                 585

tgt gac ggg aag gag gac tgt agc gac ggc tca gat gag aag gac tgc     1828
Cys Asp Gly Lys Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys
            590                 595                 600

gac tgt ggg ctg cgg tca ttc acg aga cag gct cgt gtt gtt ggg ggc     1876
Asp Cys Gly Leu Arg Ser Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly
        605                 610                 615

acg gat gcg gat gag ggc gag tgg ccc tgg cag gta agc ctg cat gct     1924
Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala
    620                 625                 630

ctg ggc cag ggc cac atc tgc ggt gct tcc ctc atc tct ccc aac tgg     1972
Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp
635                 640                 645                 650

ctg gtc tct gcc gca cac tgc tac atc gat gac aga gga ttc agg tac     2020
Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr
                655                 660                 665

tca gac ccc acg cag tgg acg gcc ttc ctg ggc ttg cac gac cag agc     2068
Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser
            670                 675                 680

cag cgc agc gcc cct ggg gtg cag gag cgc agg ctc aag cgc atc atc     2116
Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile
        685                 690                 695

tcc cac ccc ttc ttc aat gac ttc acc ttc gac tat gac atc gcg ctg     2164
Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu
    700                 705                 710

ctg gag ctg gag aaa ccg gca gag tac agc tcc atg gtg cgg ccc atc     2212
Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile
715                 720                 725                 730

tgc ctg ccg gac gcc tcc cat gtc ttc cct gcc ggc aag gcc atc tgg     2260
Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp
                735                 740                 745
```

gtc acg ggc tgg gga cac acc cag tat gga ggc act ggc gcg ctg atc 2308

Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile

750 755 760

ctg caa aag ggt gag atc cgc gtc atc aac cag acc acc tgc gag aac 2356

Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn

765 770 775

ctc ctg ccg cag cag atc acg ccg cgc atg atg tgc gtg ggc ttc ctc 2404

Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu

780 785 790

agc ggc ggc gtg gac tcc tgc cag ggt gat tcc ggg gga ccc ctg tcc 2452

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

795 800 805 810

agc gtg gag gcg gat ggg cgg atc ttc cag gcc ggt gtg gtg agc tgg 2500

Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp

815 820 825

gga gac ggc tgc gct cag agg aac aag cca ggc gtg tac aca agg ctc 2548

Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu

830 835 840

cct ctg ttt cgg gac tgg atc aaa gag aac act ggg gta ta ggggccgggg 2599

Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val

845 850 855

ccacccaaat gtgtacacct gcggggccac ccatcgtcca ccccagtgtg cacgcctgca 2659

ggctggagac tggaccgctg actgcaccag cgcccccaga acatacactg tgaactcaat 2719

ctccagggct ccaaatctgc ctagaaaacc tctcgcttcc tcagcctcca aagtggagct 2779

gggaggtaga aggggaggac actggtggtt ctactgaccc aactgggggc aaaggtttga 2839

agacacagcc tccccgcca gccccaagct gggccgaggc gcgtttgtgt atatctgcct 2899

cccctgtctg taaggagcag cgggaacgga gcttcggagc ctcctcagtg aaggtggtgg 2959

ggctgccgga tctgggctgt ggggcccttg ggccacgctc ttgaggaagc ccaggctcgg 3019

aggaccctgg aaaacagacg ggtctgagac tgaaattgtt ttaccagctc ccagggtgga 3079

cttcagtgtg tgtatttgtg taaatgggta aaacaattta tttcttttta aaaaaaaaaa 3139

aaaaaaaa 3147

<210> 2

<211> 855

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 2

```
Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly Gly Gly Pro Lys Asp Phe
 1               5                  10                  15
Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His Glu Lys Val Asn Gly Leu
            20                  25                  30
Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Val Lys Lys Val Glu
        35                  40                  45
Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu Ala Ala Val Leu Ile Gly
    50                  55                  60
Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Trp His Leu Gln
65                  70                  75                  80
Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe Asn Gly Tyr Met Arg Ile
                85                  90                  95
Thr Asn Glu Asn Phe Val Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Asn Ser Thr Glu
            100                 105                 110
Phe Val Ser Leu Ala Ser Lys Val Lys Asp Ala Leu Lys Leu Leu Tyr
        115                 120                 125
Ser Gly Val Pro Phe Leu Gly Pro Tyr His Lys Glu Ser Ala Val Thr
    130                 135                 140
Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr Tyr Trp Ser Glu Phe Ser
145                 150                 155                 160
Ile Pro Gln His Leu Val Glu Glu Ala Glu Arg Val Met Ala Glu Glu
                165                 170                 175
Arg Val Val Met Leu Pro Pro Arg Ala Arg Ser Leu Lys Ser Phe Val
            180                 185                 190
Val Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Thr Asp Ser Lys Thr Val Gln Arg
        195                 200                 205
Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Gly Leu His Ala Arg Gly Val Glu
    210                 215                 220
Leu Met Arg Phe Thr Thr Pro Gly Phe Pro Asp Ser Pro Tyr Pro Ala
225                 230                 235                 240
His Ala Arg Cys Gln Trp Ala Leu Arg Gly Asp Ala Asp Ser Val Leu
                245                 250                 255
```

```
Ser Leu Thr Phe Arg Ser Phe Asp Leu Ala Ser Cys Asp Glu Arg Gly
            260                 265                 270
Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asn Thr Leu Ser Pro Met Glu Pro His
        275                 280                 285
Ala Leu Val Gln Leu Cys Gly Thr Tyr Pro Pro Ser Tyr Asn Leu Thr
    290                 295                 300
Phe His Ser Ser Gln Asn Val Leu Leu Ile Thr Leu Ile Thr Asn Thr
305                 310                 315                 320
Glu Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr Phe Phe Gln Leu Pro Arg
                325                 330                 335
Met Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys Ala Gln Gly Thr Phe Asn
            340                 345                 350
Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro Asn Ile Asp Cys Thr Trp
        355                 360                 365
Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val Lys Val Ser Phe Lys Phe
    370                 375                 380
Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala Gly Thr Cys Pro Lys Asp
385                 390                 395                 400
Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe
                405                 410                 415
Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr Val Arg Phe His Ser Asp
            420                 425                 430
Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp
        435                 440                 445
Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr Cys Arg Thr Gly Arg Cys
    450                 455                 460
Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Thr Asp His
465                 470                 475                 480
Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala Gly His Gln Phe Thr Cys
                485                 490                 495
Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
            500                 505                 510
Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gln
        515                 520                 525
```

```
Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gln Gln Cys
    530                 535                 540
Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
545                 550                 555                 560
Lys Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His Thr Tyr Arg Cys Leu Asn
                565                 570                 575
Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Glu Asp
            580                 585                 590
Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser
        595                 600                 605
Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly
    610                 615                 620
Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile
625                 630                 635                 640
Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His
                645                 650                 655
Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp
            660                 665                 670
Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly
        675                 680                 685
Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn
    690                 695                 700
Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro
705                 710                 715                 720
Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser
                725                 730                 735
His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His
            740                 745                 750
Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile
        755                 760                 765
Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile
    770                 775                 780
Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
785                 790                 795                 800
```

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

805 810 815

Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln

820 825 830

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp

835 840 845

Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val

850 855

<210> 3

<211> 3147

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<220>

<221> CDS

<222> (1865)...(2590)

<223> Nucleic acid sequence of protease domain of MTSP1

<400> 3

tcaagagcgg cctcggggta ccatggggag cgatcgggcc cgcaagggcg gaggggccc 60

gaaggacttc ggcgcgggac tcaagtacaa ctcccggcac gagaaagtga atggcttgga 120

ggaaggcgtg gagttcctgc cagtcaacaa cgtcaagaag gtggaaaagc atggcccggg 180

gcgctgggtg gtgctggcag ccgtgctgat cggcctcctc ttggtcttgc tggggatcgg 240

cttcctggtg tggcatttgc agtaccggga cgtgcgtgtc cagaaggtct tcaatggcta 300

catgaggatc acaaatgaga attttgtgga tgcctacgag aactccaact ccactgagtt 360

tgtaagcctg gccagcaagg tgaaggacgc gctgaagctg ctgtacagcg gagtcccatt 420

cctgggcccc taccacaagg agtcggctgt gacggccttc agcgagggca gcgtcatcgc 480

ctactactgg tctgagttca gcatcccgca gcacctggtg gaggaggccg agcgcgtcat 540

ggccgaggag cgcgtagtca tgctgccccc gcgggcgcgc tccctgaagt cctttgtggt 600

cacctcagtg gtggctttcc ccacggactc caaaacagta cagaggaccc aggacaacag 660

ctgcagcttt ggcctgcacg cccgcggtgt ggagctgatg cgcttcacca cgcccggctt 720

ccctgacagc ccctaccccg ctcatgcccg ctgccagtgg gccctgcggg gggacgccga 780

ctcagtgctg agcctcacct tccgcagctt tgaccttgcg tcctgcgacg agcgcggcag 840

cgacctggtg acggtgtaca acaccctgag ccccatggag ccccacgccc tggtgcagtt 900

gtgtggcacc taccctccct cctacaacct gaccttccac tcctcccaga acgtcctgct 960

catcacactg ataaccaaca ctgagcggcg gcatcccggc tttgaggcca ccttcttcca 1020

gctgcctagg atgagcagct gtggaggccg cttacgtaaa gcccagggga cattcaacag 1080

cccctactac ccaggccact acccacccaa cattgactgc acatggaaca ttgaggtgcc 1140

caacaaccag catgtgaagg tgagcttcaa attcttctac ctgctggagc ccggcgtgcc 1200

tgcgggcacc tgccccaagg actacgtgga gatcaatggg gagaaatact gcggagagag 1260

gtcccagttc gtcgtcacca gcaacagcaa caagatcaca gttcgcttcc actcagatca 1320

gtcctacacc gacaccggct tcttagctga atacctctcc tacgactcca gtgacccatg 1380

cccggggcag ttcacgtgcc gcacggggcg gtgtatccgg aaggagctgc gctgtgatgg 1440

ctgggccgac tgcaccgacc acagcgatga gctcaactgc agttgcgacg ccggccacca 1500

gttcacgtgc aagaacaagt tctgcaagcc cctcttctgg gtctgcgaca gtgtgaacga 1560

ctgcggagac aacagcgacg agcaggggtg cagttgtccg gcccagacct tcaggtgttc 1620

caatgggaag tgcctctcga aaagccagca gtgcaatggg aaggacgact gtggggacgg 1680

gtccgacgag gcctcctgcc ccaaggtgaa cgtcgtcact tgtaccaaac acacctaccg 1740

ctgcctcaat gggctctgct tgagcaaggg caaccctgag tgtgacggga aggaggactg 1800

tagcgacggc tcagatgaga aggactgcga ctgtgggctg cggtcattca cgagacaggc 1860

tcgt gtt gtt ggg ggc acg gat gcg gat gag ggc gag tgg ccc tgg cag 1909

Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln

1 5 10 15

gta agc ctg cat gct ctg ggc cag ggc cac atc tgc ggt gct tcc ctc 1957

Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu

20 25 30

atc tct ccc aac tgg ctg gtc tct gcc gca cac tgc tac atc gat gac 2005

Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp

35 40 45

aga gga ttc agg tac tca gac ccc acg cag tgg acg gcc ttc ctg ggc 2053

Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly

50 55 60

ttg cac gac cag agc cag cgc agc gcc cct ggg gtg cag gag cgc agg 2101

Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg

65 70 75

ctc aag cgc atc atc tcc cac ccc ttc ttc aat gac ttc acc ttc gac 2149

Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp

80 85 90 95

tat gac atc gcg ctg ctg gag ctg gag aaa ccg gca gag tac agc tcc 2197

Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser

```
                100                 105                 110
atg gtg cgg ccc atc tgc ctg ccg gac gcc tcc cat gtc ttc cct gcc     2245
Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala
            115                 120                 125
ggc aag gcc atc tgg gtc acg ggc tgg gga cac acc cag tat gga ggc     2293
Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly
        130                 135                 140
act ggc gcg ctg atc ctg caa aag ggt gag atc cgc gtc atc aac cag     2341
Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln
    145                 150                 155
acc acc tgc gag aac ctc ctg ccg cag cag atc acg ccg cgc atg atg     2389
Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met
160                 165                 170                 175
tgc gtg ggc ttc ctc agc ggc ggc gtg gac tcc tgc cag ggt gat tcc     2437
Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
                180                 185                 190
ggg gga ccc ctg tcc agc gtg gag gcg gat ggg cgg atc ttc cag gcc     2485
Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala
            195                 200                 205
ggt gtg gtg agc tgg gga gac ggc tgc gct cag agg aac aag cca ggc     2533
Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly
        210                 215                 220
gtg tac aca agg ctc cct ctg ttt cgg gac tgg atc aaa gag aac act     2581
Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr
    225                 230                 235
ggg gta tag gggccggggc cacccaaatg tgtacacctg cggggccacc             2630
Gly Val  *
240
catcgtccac cccagtgtgc acgcctgcag gctggagact ggaccgctga ctgcaccagc   2690
gcccccagaa catacactgt gaactcaatc tccagggctc caaatctgcc tagaaaacct   2750
ctcgcttcct cagcctccaa agtggagctg ggaggtagaa ggggaggaca ctggtggttc   2810
tactgaccca actgggggca aaggtttgaa gacacagcct cccccgccag ccccaagctg   2870
ggccgaggcg cgtttgtgta tatctgcctc ccctgtctgt aaggagcagc gggaacggag   2930
cttcggagcc tcctcagtga aggtggtggg gctgccggat ctgggctgtg gggcccttgg   2990
```

gccacgctct tgaggaagcc caggctcgga ggaccctgga aaacagacgg gtctgagact 3050

gaaattgttt taccagctcc cagggtggac ttcagtgtgt gtatttgtgt aaatgggtaa 3110

aacaatttat ttctttttaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 3147

<210> 4

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 4

Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile
20 25 30

Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp Arg
35 40 45

Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly Leu
50 55 60

His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg Leu
65 70 75 80

Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp Tyr
85 90 95

Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met
100 105 110

Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly
115 120 125

Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr
130 135 140

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

Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met Cys
165 170 175

Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
180 185 190

Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly
195 200 205

Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val
210 215 220
Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly
225 230 235 240
Val

<210> 5
<211> 756
<212> DNA
<213> Homo Sapien
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(756)
<223> Nucleotide sequence encoding CVSP14 protease
domain
<400> 5

att ctt gga gga agc caa gtg gag aag ggt tcc tat ccc tgg cag gta 48
Ile Leu Gly Gly Ser Gln Val Glu Lys Gly Ser Tyr Pro Trp Gln Val
1 5 10 15
tct ctg aaa caa agg cag aag cat att tgt gga gga agc atc gtc tca 96
Ser Leu Lys Gln Arg Gln Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Ile Val Ser
20 25 30
cca cag tgg gtg atc acg gcg gct cac tgc att gca aac aga aac att 144
Pro Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His Cys Ile Ala Asn Arg Asn Ile
35 40 45
gtg tct act ttg aat gtt act gct gga gag tat gac tta agc cag aca 192
Val Ser Thr Leu Asn Val Thr Ala Gly Glu Tyr Asp Leu Ser Gln Thr
50 55 60
gac cca gga gag caa act ctc act att gaa act gtc atc ata cat cca 240
Asp Pro Gly Glu Gln Thr Leu Thr Ile Glu Thr Val Ile Ile His Pro
65 70 75 80
cat ttc tcc acc aag aaa cca atg gac tat gat att gcc ctt ttg aag 288
His Phe Ser Thr Lys Lys Pro Met Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Lys
85 90 95
atg gct gga gcc ttc caa ttt ggc cac ttt gtg ggg ccc ata tgt ctt 336

Met Ala Gly Ala Phe Gln Phe Gly His Phe Val Gly Pro Ile Cys Leu

100 105 110

cca gag ctg cgg gag caa ttt gag gct ggt ttt att tgt aca act gca 384

Pro Glu Leu Arg Glu Gln Phe Glu Ala Gly Phe Ile Cys Thr Thr Ala

115 120 125

ggc tgg ggc cgc tta act gaa ggt ggc gtc ctc tca caa gtc ttg cag 432

Gly Trp Gly Arg Leu Thr Glu Gly Gly Val Leu Ser Gln Val Leu Gln

130 135 140

gaa gtg aat ctg cct att ttg acc tgg gaa gag tgt gtg gca gct ctg 480

Glu Val Asn Leu Pro Ile Leu Thr Trp Glu Glu Cys Val Ala Ala Leu

145 150 155 160

tta aca cta aag agg ccc atc agt ggg aag acc ttt ctt tgc aca ggt 528

Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ile Ser Gly Lys Thr Phe Leu Cys Thr Gly

165 170 175

ttt cct gat gga ggg aga gac gca tgt cag gga gat tca gga ggt tca 576

Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ser

180 185 190

ctc atg tgc cgg aat aag aaa ggg gcc tgg act ctg gct ggt gtg act 624

Leu Met Cys Arg Asn Lys Lys Gly Ala Trp Thr Leu Ala Gly Val Thr

195 200 205

tcc tgg ggt ttg ggc tgt ggt cga ggc tgg aga aac aat gtg agg aaa 672

Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg Gly Trp Arg Asn Asn Val Arg Lys

210 215 220

agt gat caa gga tcc cct ggg atc ttc aca gac att agt aaa gtg ctt 720

Ser Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile Phe Thr Asp Ile Ser Lys Val Leu

225 230 235 240

tcc tgg atc cac gaa cac atc caa act ggt aac taa 756

Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln Thr Gly Asn *

245 250

<210> 6

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 6

Ile Leu Gly Gly Ser Gln Val Glu Lys Gly Ser Tyr Pro Trp Gln Val
1 5 10 15
Ser Leu Lys Gln Arg Gln Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Ile Val Ser
20 25 30
Pro Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His Cys Ile Ala Asn Arg Asn Ile
35 40 45
Val Ser Thr Leu Asn Val Thr Ala Gly Glu Tyr Asp Leu Ser Gln Thr
50 55 60
Asp Pro Gly Glu Gln Thr Leu Thr Ile Glu Thr Val Ile Ile His Pro
65 70 75 80
His Phe Ser Thr Lys Lys Pro Met Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Lys
85 90 95
Met Ala Gly Ala Phe Gln Phe Gly His Phe Val Gly Pro Ile Cys Leu
100 105 110
Pro Glu Leu Arg Glu Gln Phe Glu Ala Gly Phe Ile Cys Thr Thr Ala
115 120 125
Gly Trp Gly Arg Leu Thr Glu Gly Gly Val Leu Ser Gln Val Leu Gln
130 135 140
Glu Val Asn Leu Pro Ile Leu Thr Trp Glu Glu Cys Val Ala Ala Leu
145 150 155 160
Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ile Ser Gly Lys Thr Phe Leu Cys Thr Gly
165 170 175
Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ser
180 185 190
Leu Met Cys Arg Asn Lys Lys Gly Ala Trp Thr Leu Ala Gly Val Thr
195 200 205
Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg Gly Trp Arg Asn Asn Val Arg Lys
210 215 220
Ser Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile Phe Thr Asp Ile Ser Lys Val Leu
225 230 235 240
Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln Thr Gly Asn
245 250

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense primer:DSSP1l

<221> modified_base

<222> 7, 12, 17, 20, 24

<223> N is Deoxyinosine

<400> 7

tgggatnacg tntacgngcn agcncatctg 30

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense primer: DSSP2

<221> modified_base

<222> 1, 4, 7, 10, 19, 25, 30

<223> N is Deoxyinosine

<400> 8

nggnccnccn cgtagatcnc ctctnagcan gtac 34

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CVSP14 specific primer: GX-SP1-1

<400> 9

gacttaagcc agacagaccc aggagagc 28

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CVSP14 specific primer: GX-SP1-1-2AS

<400> 10

ttgtgagagg acgccacctt cagttaagc 29

<210> 11

<211> 9276

<212> DNA

<213> Pichia pastoris

<400> 11

agatctaaca tccaaagacg aaaggttgaa tgaaaccttt ttgccatccg acatccacag 60

gtccattctc acacataagt gccaaacgca acaggagggg atacactagc agcagaccgt 120

tgcaaacgca ggacctccac tcctcttctc ctcaacaccc acttttgcca tcgaaaaacc 180

agcccagtta ttgggcttga ttggagctcg ctcattccaa ttccttctat taggctacta 240

acaccatgac tttattagcc tgtctatcct ggccccccctg gcgaggttca tgtttgttta 300

tttccgaatg caacaagctc cgcattacac ccgaacatca ctccagatga gggctttctg 360

agtgtggggt caaatagttt catgttcccc aaatggccca aaactgacag tttaaacgct 420

gtcttggaac ctaatatgac aaaagcgtga tctcatccaa gatgaactaa gtttggttcg 480

ttgaaatgct aacggccagt tggtcaaaaa gaaacttcca aaagtcgcca taccgtttgt 540

cttgtttggt attgattgac gaatgctcaa aaataatctc attaatgctt agcgcagtct 600

ctctatcgct tctgaacccc ggtgcacctg tgccgaaacg caaatgggga aacacccgct 660

ttttggatga ttatgcattg tctccacatt gtatgcttcc aagattctgg tgggaatact 720

gctgatagcc taacgttcat gatcaaaatt taactgttct aacccctact tgacagcaat 780

atataaacag aaggaagctg ccctgtctta aacctttttt tttatcatca ttattagctt 840

actttcataa ttgcgactgg ttccaattga caagcttttg attttaacga cttttaacga 900

caacttgaga agatcaaaaa acaactaatt attcgaagga tccaaacgat gagatttcct 960

tcaattttta ctgcagtttt attcgcagca tcctccgcat tagctgctcc agtcaacact 1020

acaacagaag atgaaacggc acaaattccg gctgaagctg tcatcggtta ctcagattta 1080

gaaggggatt tcgatgttgc tgttttgcca ttttccaaca gcacaaataa cgggttattg 1140

tttataaata ctactattgc cagcattgct gctaaagaag aaggggtatc tctcgagaaa 1200

agagaggctg aagcttacgt agaattccct agggcggccg cgaattaatt cgccttagac 1260

atgactgttc ctcagttcaa gttgggcact tacgagaaga ccggtcttgc tagattctaa 1320

tcaagaggat gtcagaatgc catttgcctg agagatgcag gcttcatttt tgatactttt 1380

ttatttgtaa cctatatagt ataggatttt ttttgtcatt ttgtttcttc tcgtacgagc 1440

ttgctcctga tcagcctatc tcgcagctga tgaatatctt gtggtagggg tttgggaaaa 1500

tcattcgagt ttgatgtttt tcttggtatt tcccactcct cttcagagta cagaagatta 1560

agtgagaagt tcgtttgtgc aagcttatcg ataagcttta atgcggtagt ttatcacagt 1620

taaattgcta acgcagtcag gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc 1680

tcggcaccgt caccctggat gctgtaggca taggcttggt tatgccggta ctgccgggcc 1740

tcttgcggga tatcgtccat tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc 1800

tatatgcgtt gatgcaattt ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg 1860

gccgccgccc agtcctgctc gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg 1920

cgaccacacc cgtcctgtgg atctatcgaa tctaaatgta agttaaaatc tctaaataat 1980

taaataagtc ccagtttctc catacgaacc ttaacagcat tgcggtgagc atctagacct 2040

tcaacagcag ccagatccat cactgcttgg ccaatatgtt tcagtccctc aggagttacg 2100

tcttgtgaag tgatgaactt ctggaaggtt gcagtgttaa ctccgctgta ttgacgggca 2160

tatccgtacg ttggcaaagt gtggttggta ccggaggagt aatctccaca actctctgga 2220

gagtaggcac caacaaacac agatccagcg tgttgtactt gatcaacata agaagaagca 2280

ttctcgattt gcaggatcaa gtgttcagga gcgtactgat tggacatttc caaagcctgc 2340

tcgtaggttg caaccgatag ggttgtagag tgtgcaatac acttgcgtac aatttcaacc 2400

cttggcaact gcacagcttg gttgtgaaca gcatcttcaa ttctggcaag ctccttgtct 2460

gtcatatcga cagccaacag aatcacctgg gaatcaatac catgttcagc ttgagacaga 2520

aggtctgagg caacgaaatc tggatcagcg tatttatcag caataactag aacttcagaa 2580

ggcccagcag gcatgtcaat actacacagg gctgatgtgt cattttgaac catcatcttg 2640

gcagcagtaa cgaactggtt tcctggacca aatattttgt cacacttagg aacagtttct 2700

gttccgtaag ccatagcagc tactgcctgg gcgcctcctg ctagcacgat acacttagca 2760

ccaaccttgt gggcaacgta gatgacttct ggggtaaggg taccatcctt cttaggtgga 2820

gatgcaaaaa caatttcttt gcaaccagca actttggcag gaacacccag catcagggaa 2880

gtggaaggca gaattgcggt tccaccagga atatagaggc caactttctc aataggtctt 2940

gcaaaacgag agcagactac accagggcaa gtctcaactt gcaacgtctc cgttagttga 3000

gcttcatgga atttcctgac gttatctata gagagatcaa tggctctctt aacgttatct 3060

ggcaattgca taagttcctc tgggaaagga gcttctaaca caggtgtctt caaagcgact 3120

ccatcaaact tggcagttag ttctaaaagg gctttgtcac cattttgacg aacattgtcg 3180

acaattggtt tgactaattc cataatctgt tccgttttct ggataggacg acgaagggca 3240

tcttcaattt cttgtgagga ggccttagaa acgtcaattt tgcacaattc aatacgacct 3300

tcagaaggga cttctttagg tttggattct tctttaggtt gttccttggt gtatcctggc 3360

ttggcatctc ctttccttct agtgaccttt agggacttca tatccaggtt tctctccacc 3420

tcgtccaacg tcacaccgta cttggcacat ctaactaatg caaaataaaa taagtcagca 3480

cattcccagg ctatatcttc cttggattta gcttctgcaa gttcatcagc ttcctcccta 3540

attttagcgt tcaacaaaac ttcgtcgtca aataaccgtt tggtataaga accttctgga 3600

gcattgctct tacgatccca caaggtggct tccatggctc taagaccctt tgattggcca 3660

aaacaggaag tgcgttccaa gtgacagaaa ccaacacctg tttgttcaac cacaaatttc 3720

aagcagtctc catcacaatc caattcgata cccagcaact tttgagttgc tccagatgta 3780

gcacctttat accacaaacc gtgacgacga gattggtaga ctccagtttg tgtccttata 3840

gcctccggaa tagacttttt ggacgagtac accaggccca acgagtaatt agaagagtca 3900

gccaccaaag tagtgaatag accatcgggg cggtcagtag tcaaagacgc caacaaaatt 3960

tcactgacag ggaacttttt gacatcttca gaaagttcgt attcagtagt caattgccga 4020

gcatcaataa tggggattat accagaagca acagtggaag tcacatctac caactttgcg 4080

gtctcagaaa aagcataaac agttctacta ccgccattag tgaaactttt caaatcgccc 4140

agtggagaag aaaaaggcac agcgatacta gcattagcgg gcaaggatgc aactttatca 4200

accagggtcc tatagataac cctagcgcct gggatcatcc tttggacaac tctttctgcc 4260

aaatctaggt ccaaaatcac ttcattgata ccattattgt acaacttgag caagttgtcg 4320

atcagctcct caaattggtc ctctgtaacg gatgactcaa cttgcacatt aacttgaagc 4380

tcagtcgatt gagtgaactt gatcaggttg tgcagctggt cagcagcata gggaaacacg 4440

gcttttccta ccaaactcaa ggaattatca aactctgcaa cacttgcgta tgcaggtagc 4500

aagggaaatg tcatacttga agtcggacag tgagtgtagt cttgagaaat tctgaagccg 4560

tatttttatt atcagtgagt cagtcatcag gagatcctct acgccggacg catcgtggcc 4620

gacctgcagg gggggggggg gcgctgaggt ctgcctcgtg aagaaggtgt tgctgactca 4680

taccaggcct gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga 4740

gctttgttgt aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct 4800

gcgttgtcgg gaagatgcgt gatctgatcc ttcaactcag caaaagttcg atttattcaa 4860

caaagccgcc gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac caattaacca 4920

attctgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat 4980

tatcaatacc atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc 5040

agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa 5100

tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag 5160

tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttgttcaa 5220

caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaaccg ttattcattc 5280

gtgattgcgc ctgagcgaga cgaaatacgc gatcgctgtt aaaaggacaa ttacaaacag 5340

gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcatc aacaatattt tcacctgaat 5400

caggatattc ttctaatacc tggaatgctg ttttcccggg gatcgcagtg gtgagtaacc 5460

atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca 5520

gccagtttag tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatgtt 5580

tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt 5640

gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta 5700

atcgcggcct cgagcaagac gtttcccgtt gaatatggct cataacaccc cttgtattac 5760

tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt 5820

aacatcagag attttgagac acaacgtggc tttccccccc ccccctgcag gtcggcatca 5880

ccggcgccac aggtgcggtt gctggcgcct atatcgccga catcaccgat ggggaagatc 5940

gggctcgcca cttcgggctc atgagcgctt gtttcggcgt gggtatggtg gcaggccccg 6000

tggccggggg actgttgggc gccatctcct tgcatgcacc attccttgcg gcggcggtgc 6060

tcaacggcct caacctacta ctgggctgct tcctaatgca ggagtcgcat aagggagagc 6120

gtcgagtatc tatgattgga agtatgggaa tggtgatacc cgcattcttc agtgtcttga 6180

ggtctcctat cagattatgc ccaactaaag caaccggagg aggagatttc atggtaaatt 6240

tctctgactt ttggtcatca gtagactcga actgtgagac tatctcggtt atgacagcag 6300

aaatgtcctt cttggagaca gtaaatgaag tcccaccaat aaagaaatcc ttgttatcag 6360

gaacaaactt cttgtttcga acttttcgg tgccttgaac tataaaatgt agagtggata 6420

tgtcgggtag gaatggagcg ggcaaatgct taccttctgg accttcaaga ggtatgtagg 6480

gtttgtagat actgatgcca acttcagtga caacgttgct atttcgttca aaccattccg 6540

aatccagaga aatcaaagtt gtttgtctac tattgatcca agccagtgcg gtcttgaaac 6600

tgacaatagt gtgctcgtgt tttgaggtca tctttgtatg aataaatcta gtctttgatc 6660

taaataatct tgacgagcca aggcgataaa tacccaaatc taaaactctt ttaaaacgtt 6720

aaaaggacaa gtatgtctgc ctgtattaaa ccccaaatca gctcgtagtc tgatcctcat 6780

caacttgagg ggcactatct tgttttagag aaatttgcgg agatgcgata tcgagaaaaa 6840

ggtacgctga ttttaaacgt gaaatttatc tcaagatctc tgcctcgcgc gtttcggtga 6900

tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 6960

ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 7020

cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca 7080

tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta 7140

aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg 7200

gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 7260

gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 7320

cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccccctga cgagcatcac 7380

aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 7440

tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 7500

ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat 7560

ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 7620

cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 7680

ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 7740

gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 7800

atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 7860

aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 7920

aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 7980

gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 8040

cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct 8100

gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 8160

tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct 8220

ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 8280

ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc 8340

atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg 8400

cgcaacgttg ttgccattgc tgcaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct 8460

tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa 8520

aaagcggtta gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta 8580

tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc 8640

ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg 8700

agttgctctt gcccggcgtc aacacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa 8760

gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg 8820

agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc 8880

accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg 8940

gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttccttttc aatattattg aagcatttat 9000

cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata 9060

ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc 9120

atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca agaattaatt 9180

ctcatgtttg acagcttatc atcgataagc tgactcatgt tggtattgtg aaatagacgc 9240

agatcgggaa cactgaaaaa taacagttat tattcg 9276

<210> 12

<211> 1035

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<220>

<221> CDS

<222> (115)...(1035)

<223> DNA encoding full length CVSP14

<221> misc_signal

<222> (115)...(189)

<223> signal sequence

<400> 12

gattcaccac gtcttggtta atgaataaac ttgttttaaa ttggcttatt gctggtctct 60

caaggcttcc tatttttgtt tgctttagtc tctctaaaat ttcagggaaa aact atg 117

Met

1

agt ctc aaa atg ctt ata agc agg aac aag ctg att tta cta cta gga 165

Ser Leu Lys Met Leu Ile Ser Arg Asn Lys Leu Ile Leu Leu Leu Gly

5 10 15

ata gtc ttt ttt gaa caa ggt aaa tct gca gct ctt tcg ctc ccc aaa 213

Ile Val Phe Phe Glu Gln Gly Lys Ser Ala Ala Leu Ser Leu Pro Lys

20 25 30

gct ccc agt tgt ggg cag agt ctg gtt aag gta cag cct tgg aat tat 261

Ala Pro Ser Cys Gly Gln Ser Leu Val Lys Val Gln Pro Trp Asn Tyr

35 40 45

ttt aac att ttc agt cgc att ctt gga gga agc caa gtg gag aag ggt 309

Phe Asn Ile Phe Ser Arg Ile Leu Gly Gly Ser Gln Val Glu Lys Gly

50 55 60 65

tcc tat ccc tgg cag gta tct ctg aaa caa agg cag aag cat att tgt 357

Ser Tyr Pro Trp Gln Val Ser Leu Lys Gln Arg Gln Lys His Ile Cys

70 75 80

gga gga agc atc gtc tca cca cag tgg gtg atc acg gcg gct cac tgc 405

Gly Gly Ser Ile Val Ser Pro Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His Cys

85 90 95

att gca aac aga aac att gtg tct act ttg aat gtt act gct gga gag 453

Ile Ala Asn Arg Asn Ile Val Ser Thr Leu Asn Val Thr Ala Gly Glu

100 105 110

tat gac tta agc cag aca gac cca gga gag caa act ctc act att gaa 501

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

115 120 125

act gtc atc ata cat cca cat ttc tcc acc aag aaa cca atg gac tat 549

Thr Val Ile Ile His Pro His Phe Ser Thr Lys Lys Pro Met Asp Tyr

```
130                 135                 140                 145
gat att gcc ctt ttg aag atg gct gga gcc ttc caa ttt ggc cac ttt      597
Asp Ile Ala Leu Leu Lys Met Ala Gly Ala Phe Gln Phe Gly His Phe
                150                 155                 160
gtg ggg ccc ata tgt ctt cca gag ctg cgg gag caa ttt gag gct ggt      645
Val Gly Pro Ile Cys Leu Pro Glu Leu Arg Glu Gln Phe Glu Ala Gly
            165                 170                 175
ttt att tgt aca act gca ggc tgg ggc cgc tta act gaa ggt ggc gtc      693
Phe Ile Cys Thr Thr Ala Gly Trp Gly Arg Leu Thr Glu Gly Gly Val
        180                 185                 190
ctc tca caa gtc ttg cag gaa gtg aat ctg cct att ttg acc tgg gaa      741
Leu Ser Gln Val Leu Gln Glu Val Asn Leu Pro Ile Leu Thr Trp Glu
    195                 200                 205
gag tgt gtg gca gct ctg tta aca cta aag agg ccc atc agt ggg aag      789
Glu Cys Val Ala Ala Leu Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ile Ser Gly Lys
210                 215                 220                 225
acc ttt ctt tgc aca ggt ttt cct gat gga ggg aga gac gca tgt cag      837
Thr Phe Leu Cys Thr Gly Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala Cys Gln
                230                 235                 240
gga gat tca gga ggt tca ctc atg tgc cgg aat aag aaa ggg gcc tgg      885
Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu Met Cys Arg Asn Lys Lys Gly Ala Trp
            245                 250                 255
act ctg gct ggt gtg act tcc tgg ggt ttg ggc tgt ggt cga ggc tgg      933
Thr Leu Ala Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg Gly Trp
        260                 265                 270
aga aac aat gtg agg aaa agt gat caa gga tcc cct ggg atc ttc aca      981
Arg Asn Asn Val Arg Lys Ser Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile Phe Thr
    275                 280                 285
gac att agt aaa gtg ctt tcc tgg atc cac gaa cac atc caa act ggt     1029
Asp Ile Ser Lys Val Leu Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln Thr Gly
290                 295                 300                 305
aac taa                                                         1035
Asn  *
```

<210> 13

<211> 306

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)...(25)

<223> signal peptide

<400> 13

```
Met Ser Leu Lys Met Leu Ile Ser Arg Asn Lys Leu Ile Leu Leu Leu
 1               5                  10                  15
Gly Ile Val Phe Phe Glu Gln Gly Lys Ser Ala Ala Leu Ser Leu Pro
            20                  25                  30
Lys Ala Pro Ser Cys Gly Gln Ser Leu Val Lys Val Gln Pro Trp Asn
        35                  40                  45
Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Arg Ile Leu Gly Gly Ser Gln Val Glu Lys
    50                  55                  60
Gly Ser Tyr Pro Trp Gln Val Ser Leu Lys Gln Arg Gln Lys His Ile
65                  70                  75                  80
Cys Gly Gly Ser Ile Val Ser Pro Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His
                85                  90                  95
Cys Ile Ala Asn Arg Asn Ile Val Ser Thr Leu Asn Val Thr Ala Gly
            100                 105                 110
Glu Tyr Asp Leu Ser Gln Thr Asp Pro Gly Glu Gln Thr Leu Thr Ile
        115                 120                 125
Glu Thr Val Ile Ile His Pro His Phe Ser Thr Lys Lys Pro Met Asp
    130                 135                 140
Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Lys Met Ala Gly Ala Phe Gln Phe Gly His
145                 150                 155                 160
Phe Val Gly Pro Ile Cys Leu Pro Glu Leu Arg Glu Gln Phe Glu Ala
                165                 170                 175
Gly Phe Ile Cys Thr Thr Ala Gly Trp Gly Arg Leu Thr Glu Gly Gly
            180                 185                 190
Val Leu Ser Gln Val Leu Gln Glu Val Asn Leu Pro Ile Leu Thr Trp
        195                 200                 205
```

Glu Glu Cys Val Ala Ala Leu Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ile Ser Gly
210 215 220
Lys Thr Phe Leu Cys Thr Gly Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala Cys
225 230 235 240
Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu Met Cys Arg Asn Lys Lys Gly Ala
245 250 255
Trp Thr Leu Ala Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg Gly
260 265 270
Trp Arg Asn Asn Val Arg Lys Ser Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile Phe
275 280 285
Thr Asp Ile Ser Lys Val Leu Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln Thr
290 295 300
Gly Asn
305

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 14
tctctcgaga aaagaattct tggaggaagc caagtggag 39

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 15
tttgtggggc ccataagtct tccagagctg cgg 33

<210> 16
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 16

attcgcggcc gcttagttac cagtttggat gtgttcgtg 39

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 17

ccgcagctct ggaagactta tgggccccac aaa 33

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 18

gttaagcggc cccagcctgc agttgtac 28

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 19

gctctcctgg gtctgtctgg cttaagt 27

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> start site

<400> 20

aaaactatga gt 12

<210> 21

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CVSP14 specific primer

<400> 21

ggaattccat atgagcagcg gccatatcga cgacgacgac aaaattcttg gaggaagcca 60

agtggag 67

<210> 22

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CVSP14 specific primer

<400> 22

ccgctcgagg ttaccagttt ggatgtgttc gtgg 34