

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-535161

(P2004-535161A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004. 11. 25)

(51) Int. Cl. ⁷

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 38/55
A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 11/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 17/00

テーマコード (参考)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 197 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-571825 (P2002-571825)
(86) (22) 出願日 平成14年3月8日 (2002. 3. 8)
(85) 翻訳文提出日 平成15年9月8日 (2003. 9. 8)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/007215
(87) 国際公開番号 W02002/072769
(87) 国際公開日 平成14年9月19日 (2002. 9. 19)
(31) 優先権主張番号 60/274, 522
(32) 優先日 平成13年3月8日 (2001. 3. 8)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/274, 519
(32) 優先日 平成13年3月8日 (2001. 3. 8)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

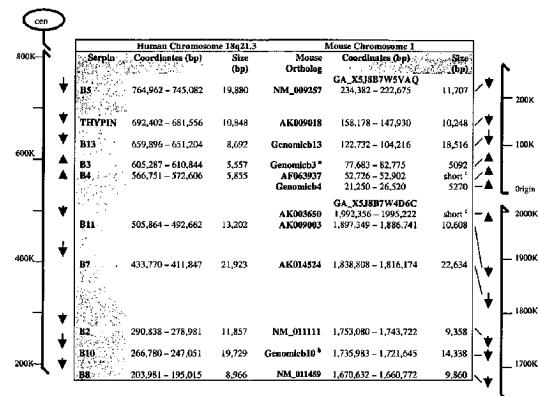
(71) 出願人 591123609
イミュネックス・コーポレーション
IMMUNEX CORPORATION
アメリカ合衆国カリフォルニア州9132
0-1799, サウザンド・オークス, ワ
ン・アムゲン・センター・ドライブ
(74) 代理人 100089705
弁理士 社本 一夫
(74) 代理人 100076691
弁理士 増井 忠次
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト・セルピン・ポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、サイピン、およびヒト・セルピン・ポリペプチドファミリーの他の新規メンバー、サイピン・ポリペプチドを作成する方法、およびこれらのポリペプチドを用いて多様な医学的障害を治療する方法、並びにサイピン・ポリペプチド活性をアゴナイズするかまたはアンタゴナイズする化合物に関してスクリーニングする方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその抗原性断片；
(b) 配列番号 2 のアミノ酸 61～107、配列番号 2 のアミノ酸 108～373、および配列番号 2 のアミノ酸 374～395 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドであって、そしてさらに Gene Fold を用いて解析した際、セルピン (serpin) である少なくとも 5 つのヒットを生じ、そしてそのスコアが 999.999 である、アミノ酸配列を有する、前記ポリペプチド；
(c) 配列番号 2 のアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するサイピン (Thypin) 変異体であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも 70%、少なくとも 75%、
10 少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97.5%、少なくとも 99%、そして少なくとも 99.5% からなる群より選択される、前記変異体；および
(d) (a)～(c) のいずれか記載のポリペプチドであって、配列番号 2 に示すようなアミノ酸配列を有するサイピン・ポリペプチドともまた特異的に結合する抗体と特異的に結合する、前記ポリペプチド
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

【請求項 2】

非常にストリンジェントな条件下で、配列番号 1 のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズ可能な核酸分子にコードされるポリペプチドであって、前記の非常にストリンジェ
20 ントな条件が、50%ホルムアミドおよび 6×SSC 中 42 でのハイブリダイズ、並びに 0.2×SSC 中 68 での洗浄を含んでなり、そしてさらに、前記ポリペプチドが Gene Fold を用いて解析した際、セルピンである少なくとも 5 つのヒットを生じ、そしてそのスコアが 999.999 である、アミノ酸配列を有する、前記ポリペプチド。

【請求項 3】

非常にストリンジェントな条件下で、配列番号 1 のヌクレオチド配列の相補体とハイブリダイズ可能な核酸分子にコードされるポリペプチドであって、前記の非常にストリンジェ
30 ントな条件が、50%ホルムアミドおよび 6×SSC 中 42 でのハイブリダイズ、並びに 0.2×SSC 中 68 での洗浄を含んでなり、そしてさらに、前記ポリペプチドが配列番号 2 のアミノ酸 61～107、配列番号 2 のアミノ酸 108～373、および配列番号 2 のアミノ酸 374～395 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなる、前記ポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 2 のアミノ酸 61～107、配列番号 2 のアミノ酸 108～373、および配列番号 2 のアミノ酸 374～395 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドであって、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するサイピン・ポリペプチドと特異的に反応する抗体を誘発することが可能な、前記ポリペプチド

【請求項 5】

少なくとも 15 ヌクレオチドを有する単離核酸分子であって、前記核酸分子が、非常にストリンジェントな条件下で、配列番号 1 のヌクレオチド配列またはその相補体とハイブリ
40 ダイズ可能であり、そしてさらに、前記の非常にストリンジェントな条件が、50%ホルムアミドおよび 6×SSC 中 42 でのハイブリダイズ、並びに 0.2×SSC 中 68 での洗浄を含んでなる、前記単離核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するサイピン・ポリペプチドまたはその変異体をコード可能な、請求項 5 記載の単離核酸分子。

【請求項 7】

配列番号 1 に示すようなヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 5 記載の核酸分子。

【請求項 8】

請求項 5～7 いずれか 1 項の核酸に対応する、単離ゲノム核酸。

【請求項 9】

請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の核酸を少なくとも 1 つ含んでなる、発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の核酸を少なくとも 1 つ含んでなる、組換え宿主細胞。

【請求項 11】

核酸が宿主細胞ゲノムに組み込まれている、請求項 10 の組換え宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項の核酸にコードされるポリペプチドを産生する方法であって、前記ポリペプチドの発現を促進する条件下で、組換え宿主細胞を培養することを含んでなり、ここで組換え宿主細胞が請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の核酸を少なくとも 1 つ含んでなる、前記方法。 10

【請求項 13】

前記ポリペプチドを精製することをさらに含んでなる、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

請求項 13 の方法によって産生されるポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 4 または請求項 14 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと特異的に結合する、単離抗体。

【請求項 16】

モノクローナル抗体である、請求項 15 の抗体。 20

【請求項 17】

ヒト抗体である、請求項 15 の抗体。

【請求項 18】

ヒト化抗体である、請求項 15 の抗体。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 4 または請求項 14 のいずれか 1 項のポリペプチドの活性を阻害する、請求項 15 の抗体。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 4 または請求項 14 のいずれか 1 項のポリペプチドの阻害剤を設計する方法であって、こうしたポリペプチドの三次元構造を決定し、基質のありうる結合部位の三次元構造を解析し、予測される反応部位を取り込む分子を合成し、そして該分子のポリペプチド阻害活性を決定する工程を含んでなる、前記方法。 30

【請求項 21】

サイピン・ポリペプチド活性を改変する化合物を同定する方法であって：

(a) 請求項 1 ~ 4 または請求項 14 のいずれか 1 項のポリペプチドと試験化合物を混合し；そして

(b) 試験化合物が前記ポリペプチドのサイピン・ポリペプチド活性を改変するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 22】

サイピン・ポリペプチドの結合活性を阻害する化合物を同定する方法であって：

(a) 請求項 1 ~ 4 または請求項 14 のいずれか 1 項のポリペプチドおよび前記ポリペプチドの結合パートナーと試験化合物を混合し；そして

(b) 試験化合物が前記ポリペプチドの結合活性を阻害するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 4 または請求項 14 のいずれか 1 項のポリペプチドおよび前記ポリペプチドのアゴニストからなる群より選択される化合物を少なくとも 1 つ提供することを含んでなる、プロテアーゼ阻害活性を増加させる方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 4 または請求項 1 4 のいずれか 1 項のポリペプチドおよび前記ポリペプチドのアゴニストからなる群より選択される化合物を少なくとも 1 つ患者に投与することによって、患者におけるプロテアーゼ阻害活性を増加させることを含んでなる、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 4 または請求項 1 4 のいずれか 1 項のポリペプチドのアンタゴニストを少なくとも 1 つ提供することを含んでなる、プロテアーゼ阻害活性を減少させる方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 4 または請求項 1 4 のいずれか 1 項のポリペプチドのアンタゴニストを少なくとも 1 つ患者に投与することによって、患者においてプロテアーゼ阻害活性を減少させることを含んでなる、請求項 2 5 の方法。 10

【請求項 2 7】

アンタゴニストが、前記ポリペプチドに特異的に結合し、そして前記ポリペプチドの活性を阻害する抗体である、請求項 2 5 の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 4 または請求項 1 4 のいずれか 1 項のポリペプチド、前記ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストからなる群より選択される化合物を少なくとも 1 つ投与することを含んでなる、サイピン仲介障害を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

本出願は、3 5 U . S . C . 1 1 9 (e) に基づいて、米国仮出願第 6 0 / 2 7 4 , 5 1 9 号、2 0 0 1 年 3 月 8 日提出；および米国仮出願第 6 0 / 2 7 4 , 5 2 2 号、2 0 0 1 年 3 月 8 日提出の優先権を主張し、前記出願の開示は、本明細書に完全に援用される。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

本発明は、サイピン (T h y p i n) およびヒト・セルピン (s e r p i n) ・ポリペプチドファミリーの他の新規メンバー、並びにこうしたセルピン・ポリペプチドを作成し、そして使用方法に関する。

【背景技術】

30

【0 0 0 3】

(発明の背景)

「セルピン」は、一本鎖 4 0 ~ 6 0 k D a タンパク質群のメンバーに与えられる名称であり、この多くは、ファミリーの名称が元来由来する活性である、セリンプロテアーゼ阻害剤である (概説には、例えば、Bird, Results Probl Cell Differ 2 4 : 6 3 - 8 9 (1 9 9 8) ; Pemberton, Cancer J 1 0 (1) : 1 - 1 1 (1 9 9 7) ; Worrall, Biochem Soc Trans 2 7 (4) : 7 4 6 - 5 0 (1 9 9 9) ; および Irving, Genome Res 1 0 : 1 8 4 5 - 6 4 (2 0 0 0) を参照されたい)。セルピンは一次アミノ酸配列レベルで保存され、そしてその三次構造においてもまた保存される。セルピン・ファミリーメンバーは、一般的に、約 1 5 ~ 5 0 % のアミノ酸配列同一性を共有する。セルピンの三次元コンピューター生成モデルは実質的に重ね合わせ可能である。セルピンは、脊椎動物および動物ウイルス、植物および昆虫で発見され、そしてこのスーパーファミリーの同定されたメンバーは 3 0 0 近い。 40

【0 0 0 4】

セルピンは、細胞内または細胞外空間に局在することが可能であり、後者は古典的な N 末端シグナル配列に仲介される。セルピン・ファミリーのサブセット、オボアルブミン様セルピン (または「オブ・セルピン (o v - s e r p i n s) 」) は、N 末端近くに見出される切断不能条件的 (f a c u l t a t i v e) シグナル配列を有する (Remold-O'Donnell, FEBS Letters 3 1 5 : 1 0 5 - 1 0 8 (1 9 9 3 50

))。この非規範的シグナル配列を所持するオブ-セルピンは、細胞の内側および外側両方に二重局在を示すことが可能であり、そして異なる細胞内および細胞外プロテアーゼを阻害すると推測される。二重局在を持つセルピンの例は、PAI-2である。この二重局在の制御は、扁平上皮癌におけるSCCAなど、多様な病理に関連する血漿レベル上昇を生じる可能性がある(Pemberton, 1997)。

【0005】

阻害性セルピンの多くに標的を提供するセリンプロテアーゼは、生物学の多くの側面に関与し、そしてこれらを制御するが、これらの側面には：細胞外マトリックスの分解(エラスターゼなど)、血管止血(凝血におけるトロンピン、血栓溶解におけるプラスミンなど)、補体活性化(補体因子など)、炎症および高血圧における血管拡張(カリクレインなど)、および消化(トリプシンなど)が含まれる。白血球は細胞傷害反応に関与する多くの異なるセリンプロテアーゼ(例えばグランザイム、キマーゼ)を産生し、そして小胞中に貯蔵する。セルピンはまた、細胞遊走にも役割を果たす。

10

【0006】

セルピン・ファミリーメンバーは、タンパク質フォールディングのシャペロン、貯蔵タンパク質、および輸送ホルモンとして働くことを含め、多様な細胞内および細胞外プロセスに関与する。阻害性セルピンは、多くの重要な生物学的活性に関与し、これらには：補体活性化；線維素溶解；凝血；細胞分化；腫瘍抑制；および腫瘍生存に関与する選択プロセス(すなわちアポトーシスおよび細胞遊走)が含まれる。セルピン中の突然変異は、いくつかの疾患を引き起こすことが可能であり、このうちいくつかはセルピン重合に関与する(Irvingら、2000)。こうした疾患には、例えば凝血障害、肺気腫、肝硬変および痴呆が含まれる。

20

【0007】

多くのセルピンは、ヒト血漿中に比較的高レベルで見られる。血漿セルピンは、多様にグリコシル化されているが、このグリコシル化は、活性に必要な可能性もある(Potempaら、J Biol Chem 269:15957(1994))。これらには、結合組織の再構築に関与する1アンチトリプシン(1AT)；補体活性化を調節するC1阻害剤；線維素溶解を調節するのを補助する、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤1および2(PAI-1およびPAI-2)；および凝血カスケードを制御するのに関与するアンチトロンピンが含まれる。やはり血液に存在するのは、切断されると、血圧を調節するのを補助する血管収縮性ペプチドを生じるアンギオテンシノーゲンと共に、チロキシン結合グロブリン(TBG)およびコルチコステロイド結合グロブリン(CBG)である。TBGのタンパク質分解切断は、チロキシンの部位特異的放出のための機構を提供するようである(Schussler, Thyroid 10(2):141-49(2000))。セルピンであるマスピン(maspin)、PAI-2および1ATは、特定の状況下で、重合可能である(Pemberton, 1997)。AT-IIIなどのいくつかのセルピンは、ヘパリンなどのポリ硫酸化オリゴ糖に活性化されると、はるかに高いレベルの阻害活性を達成する(Potempaら、1994)。ヘパリン補助因子IIに結合することが示された他のセルピンには、プロテアーゼ、ネキシン-1、活性プロテインC阻害剤およびPAI-1が含まれる(Potempaら、1994)。

30

40

【0008】

オブ-セルピンは、ニワトリ・オボアルブミンと比較的高い度合いの相同性を持つことによって特徴付けられる。オブ-セルピンは、例えば、Worrallら、1999およびRemold-O'Donnell、1993に概説される。オブ-セルピンは、一般的に、8つのエクソン、7つのイントロン、および非常に保存されたイントロン-エクソン境界を有するが、オブ-セルピンPI-6は7つのエクソンおよび6つのイントロンしか持たない。オブ-セルピンは、典型的には、他のセルピンに見られる伸長されたN末端およびC末端領域を欠く。さらに、これらはアミノ末端近くに内部疎水性配列を所持し、該配列は、タンパク質が発現される細胞の種類または細胞の分化状態に応じて、分泌および

50

細胞内保持両方を可能にする。オブ・セルピンは、他のセルピンより、互いにより高い度合いのアミノ酸相同性を有する（例えばセルピンは互いに40%～50%相同であるが、他のセルピンとは約30%しか相同でない）。さらに、オブ・セルピンは、C末端に最後から2番目のセリンを有し、そしてほぼ同一のスプライシング・結合部位置を有する。オブ・セルピンは、大部分細胞内であるが、いくつかは分泌されると共に細胞内でも見出される（例えばマスピンおよびPAI-2）。

【0009】

セルピンが関連付けられている他の生理学的プロセスには、腫瘍浸潤の防止（マスピン）、貯蔵（オボアルブミン）およびタンパク質フォールディングにおけるシャペロンとしての機能（HSP47）が含まれる（例えば、Whissstockら, Trends Biochem Sci 23(2):63-67(1998); Saukら, Connective Tissue Res 37(1-2):105-119(1998)を参照されたい）。熱ショックタンパク質HSP47は、コラーゲン・プロセッシングにおける役割に関して主に研究されているが、ときに小胞体から逃れて、そして細胞表面に達し、このことからSaukらは、癌細胞の発展および/または転移性浸潤中の細胞遊走を変調可能であると提唱した（Saukら、1998）。

10

【0010】

セルピン機能障害の臨床的表明（manifestation）には、肺気腫および肝硬変が含まれ（Whissstockら、1998; Bird、1998）、これらは、通常、好中球エラスターゼによる肺胞損傷を調節する、1-プロテイナーゼ阻害剤（「1-アンチトリプシン」とも呼ばれる）欠損に関連する。1-プロテイナーゼ阻害剤突然変異体が肝臓に集積すると、肝炎または肝硬変を生じる可能性がある（Bird、1998）。再発性血栓塞栓性疾患の根底に、アンチトロンピンIII欠損がある可能性があり、そして特定の出血障害は、2-アンチプラスミン活性欠乏に関連する可能性があり、これはより高いレベルの活性プラスミンを生じ、したがって線維素溶解増加を生じるし、一方、セルピン機能障害の他の臨床的表明には、トロンピンを標的とし、それによって凝血カスケードを阻害するアンチトロンピンに関連する血栓症が含まれる（Bird、1998）。アンチトロンピンIIIおよび2-アンチプラスミンにおける突然変異は、調節されない凝血障害に関連し、そして遺伝性血管神経性浮腫が、C1エラスターゼを標的とし、そして補体カスケードに関与する酵素であるC1阻害剤の欠損に関与することにもまた注目されてきている（Potempaら、1998; Whissstock、1998）。

20

30

【0011】

変形性関節炎および慢性関節リウマチの多くの側面が、細胞浸潤、すなわち組織区画を分離する解剖学的バリアを細胞が横断する能力を伴い、そしてプラスミノゲンアクチベーターおよびマトリックスメタロプロテイナーゼなどのプロテアーゼが、炎症関節において、浸潤および増殖細胞の活性を調節するのに役割を果たすことが注目されてきている（Del Rossoら, Clin Exp Rheumatol 17:485-98(1999)）。Del Rossoらは、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター（uPA）が、関節炎関節における細胞外マトリックス破壊および病変形成に役割を果たす証拠を要約する。彼らは、プラスミノゲン活性化系を薬理的に調節することが、関節炎における骨病変および関節強直症の発展を防止するのに価値あるアプローチである可能性があるとし唆する。

40

【0012】

セルピン・ファミリーはまた、ウイルス病原性に役割を果たすウイルスタンパク質もまた含む。例えば牛痘サイトカイン反応修飾因子遺伝子（CrmA）は、多様な刺激によって誘導されるアポトーシスを遮断可能であり、そしていくつかのインターロイキン-1変換酵素（ICE様システインプロテアーゼ）を阻害することが知られる。CrmAは、牛痘ウイルスの病原性因子とみなされる。SERP1（粘液腫ウイルス）はuPA、組織プラスミノゲンアクチベーター（tPA）およびプラスミンを標的とし、そして粘液腫ウ

50

イルス病原性を促進する。

【0013】

オブ-セルピンは、18q21.3の、BCL2よりテロメア側の500kb領域内にクラスター形成するようである(Silvermanら, Tumor Biol 19: 480-87(1998))。2つのSCCA遺伝子は、この領域において10kb未満しか離れておらず、そしてPAI-2およびマスピン(SERPINB5またはPI5とも呼ばれる)をコードする遺伝子と隣接する。18q21.3にマッピングされる、さらなるセルピンは、細胞質アンチプロテイナーゼ2(CAP2、PI8とも呼ばれる)、骨髄関連セルピン(ボマピン(bomapin)、PI10またはセルピンB10とも呼ばれる)、ハーピン(hurpin)(SERPINB13または「ヘッドピン(headpin)」とも呼ばれる)およびメグシンである。いくつかのこれらのセルピンの順序は、セントロメアからテロメア方向に、マスピン、ハーピン、SCCA-2、SCCA-1、メグシン、PAI-2、ボマピンおよびCAP2である。SCCA-2コード領域がクローニングされており、そしてWO 9714425に開示される。この遺伝子クラスターを含有するコンティグは、NCBIウェブサイトで、ヌクレオチド検索を用い、そして以下のコンティグ番号: AC019355; AP001404; またはAC015536の1つを入力して、見出すことが可能である。染色体18qは、頭部および頸部の癌、並びに他の悪性腫瘍において、破壊点およびヘテロ接合性の喪失と関連することが知られ、したがって、このクラスター内のセルピン遺伝子機能が損なわれていない(intact)ことが、腫瘍増殖に不都合である可能性が示唆される(Springら, Biochem Biophys Res Comm 264: 299-304(1999))。

【0014】

セルピンのいくつかは識別可能なプロテアーゼ阻害活性を持たず、一方、他のセルピンはセリンまたはシステインプロテアーゼを阻害することが示されてきている(例えばPemberton、1997を参照されたい)。オブ-セルピンの大部分はセリンプロテアーゼを阻害するが、例えばSCCA-1は、パパイン、カテプシンL、SおよびKなどのシステインプロテアーゼを阻害し、一方、近く関連するSCCA-2(92%アミノ酸配列同一性)は、マスト細胞キマーゼおよびカテプシンGなどのキモトリプシン様セリンプロテアーゼを阻害する。SCCA-1は、主に細胞内部に見出され、一方、より酸性であるSCCA-2は、主に扁平上皮癌で発現され、そして細胞の外に放出される(Suminamiら, Tumor Biol 19: 488-93(1998))。牛痘CrmAタンパク質はまた、システインプロテイナーゼ阻害剤でもある。ハーピンは、この種の活性を所持する他のセルピンとのヒンジ領域相同性に基づいて、阻害性セルピンであると予測される(Springら、1999)。

【0015】

すべてのセルピンに所持される基本骨格(scaffold)には、通常、9つのらせんおよび3つのβ-シートが含まれる。プロテイナーゼを阻害するセルピンは、カルボキシ末端から30~40アミノ酸に位置する、約20~30アミノ酸の反応部位ループまたは「RSL」を介してプロテイナーゼを阻害する。RSLは、タンパク質表面に曝露され、そして非標的プロテアーゼによる切断を受けやすい(例えばPotempaら、1994を参照されたい)。セルピン分子のコア構造は、3つのβ-シートの西洋ナシ型形状にフォールディングされ、この構造の最上部にRSLが提示される。RSLは標的プロテイナーゼ基質を模倣すると考えられる「おとり(bait)」配列を含有する。阻害性セルピンは、特定のセリンプロテアーゼ基質を模倣し、そしてRSLで切断される際にプロテアーゼに共有結合することによって、セリンプロテアーゼ活性を制御する。標的プロテアーゼによる切断に際して、阻害性セルピンは、「圧迫から弛緩(stressed-to-relaxed)」遷移と呼ばれる劇的なコンホメーション変化を経るが、これには残った反応部位ループのβ-シートの1つへの挿入が付随する。この遷移中、セルピンは、標的プロテアーゼと安定な熱耐性複合体を形成する。RSL配列、並びに特定のP1および隣接するアミノ酸残基は、阻害性セルピンのプロテアーゼに関する特異性を決定

する。R S Lは、セルピン・ファミリーメンバーの重要な特徴とみなされ、そしてこの構造は、いかなるプロテイナーゼも阻害することが知られていないセルピンにおいてさえ、タンパク質の最上部に曝露された表面ループ中に提示される。

【0016】

阻害活性を持つセルピンは、標的プロテアーゼへの付着に関連するセルピン・コンホメーション変化を調節し、そして変調するのに重要な、いくつかの領域を所持する。I r v i n gら(2000)に要約されるように、これらはヒンジ領域(R S LのP 15 - P 9部分)；裂け目(b r e a c h)(A - シートへのR S Lの最初の挿入点である、A - シートの最上部に位置する)；シャッター(A - シートへのR S Lの最初の挿入点である、A - シートの最上部に位置する)；およびゲート(鎖s 3 Cおよびs 4 Cを含む；A - シートに挿入されるには、R S Lは鎖s 3 Cおよびs 4 Cを連結する - ターン周囲を通過しなければならない)である。阻害性セルピンは、タンパク質が圧迫から弛緩遷移を経ることを可能にするのに必要と考えられる上記領域に位置する多くの重要なアミノ酸残基で、高い度合いの保存を所持する(例えば、I r v i n gら、2000の表2を参照されたい)。

【0017】

プロテアーゼ阻害機能を欠くセルピンは、おとり配列内で切断するプロテイナーゼを引きつける「おとり」配列を利用して、生物学的エフェクターを活性化可能である。白血球エラスターゼ阻害剤(L E I)は例えば、セリンプロテアーゼであるエラスターゼによって、アポトーシス中にDNAを分解するよう機能するデオキシリボヌクレアーゼに変換されるようである(W O 99/58560に論じられる)。別のセルピンであるチロキシン結合グロブリンは、タンパク質分解的に切断されて、体の特定の部位で生物学的に活性であるT₄を放出し(S c h u s s l e r、2000)、そして血清に存在するアンジオテンシノーゲンは、その標的プロテイナーゼによって切断されて、生物学的に活性であるアンジオテンシンタンパク質を生成する。同様に、コルチコステロイド結合タンパク質は、炎症部位でエラスターゼによって切断され、局所的にコルチコール(c o r t i c o l)を放出する(S c h u s s l e r、2000)。

【0018】

セルピンであるP A I - 1およびP A I - 2は、細胞外マトリックスのタンパク質分解破壊を制御するのに関与する。さらに、実験により、P A I - 2がおそらくプロテアーゼを遮断することによって、T N F に誘導されるアポトーシスに対して細胞を防御するが、P A I - 2は他のアポトーシスシグナルに対しては防御しないことが示されてきている(概説にはB i r d、1998を参照されたい)。P A I - 2はまた、抗炎症および増殖制御リポコルチン(アネキシン)に結合することもまた示されてきている。したがって、P A I - 2は炎症または増殖因子シグナル伝達の制御に関与する可能性がある。

【0019】

プロテイナーゼ阻害剤 - 9(P I - 9)は、グランザイムBへの曝露から生じる自己誘導アポトーシスから細胞傷害性Tリンパ球およびナチュラルキラー細胞を防御することが提唱されているオブ - セルピンであり、グランザイムBはこれらのリンパ球が産生して標的細胞においてDNA分解を誘導する酵素である(B i r d、1998)。P I - 9は、分泌されず、そしてリンパ系組織に限定されているようである。別の阻害性セルピン、プロテアーゼ・ネキシンI(P N - 1)は分泌され、そして強力なヘパリン依存トロンピンおよびウロキナーゼ阻害剤である(B i r d、1998)。P N - 1がニューロン細胞に対するトロンピンの作用のバランスを取り、それによってそうでなければニューロン表面上の受容体に対するトロンピンの作用によって誘導されるであろうアポトーシスから神経細胞を救出することが提唱されている(B i r d、1998)。

【0020】

セルピンは、元来、いくつかの腫瘍細胞に産生されるマトリックス分解セリンプロテアーゼu P Aおよびプラスミンを直接阻害することによって、腫瘍浸潤を抑制するのに関与することが示された。腫瘍が産生するプロテアーゼは、腫瘍が転移する能力を促進すると考

えられ、したがって療法的介入の標的である。カルパインなどのいくつかのシステインプロテアーゼが、腫瘍監視に関与するアポトーシス経路に関連付けられてきている (Pemberton、1997)。

【0021】

腫瘍抑制能が立証されている1つのセルピンは、オブ-セルピン、マスピンである。マスピンは、主に、上皮細胞(乳房および前立腺)の膜分画に見られ、そしてその発現は、乳房腫瘍上皮において下方制御されている (Sagerら、"Chemistry and Biology of Serpins," 中, Churchら監修, Plenum Press, NY, 1997, 77-88ページに概説される)。マスピンは、乳房および前立腺腫瘍細胞両方の浸潤性を抑制することが示されてきているが、い

10

【0022】

いくつかの癌では、特定のセルピンの血漿レベルの上昇は、癌進行のマーカーとして役立つ。例えば、1ATと複合体を形成している前立腺特異的抗原(PSA)レベルを用いて、前立腺癌の進行を監視する (Pemberton、1997)。前立腺癌の腫瘍マーカーとして用いる別のセルピンは、WO 99/58560に記載されるプロスタピン(prostapin)である。オブ-セルピンであるSCCA-1およびSCCA-2は、実際、元来は扁平上皮癌抗原として同定され、そして通常、両方のSCCAが反応するモノクローナル抗体を用いてこの種の腫瘍の進行を監視する (Barnesら、Gynecol Oncol 78:62-66(2000))。SCAAは、頸管(cervix)、肺および食道の扁平上皮癌で上昇し、そしてSCCAレベルは、これらの腫瘍の進行した症例において、疾患の度合いの血清学的マーカーとして用いられる (Silvermanら、1998; Barnesら、2000)。Suminamiら(1998)は、上皮癌で産生されるSCCAが、主にSCCA-2であると報告し、そしてSCCA-2が通常、炎症から上皮細胞を保護すると提唱する。SCCA血清レベルの上昇はまた、炎症構成要素による良性皮膚障害を持つ患者でも観察されてきている。こうした状態には、乾癬および湿疹が含まれる (Barnesら、2000)。SCCA-1およびSCCA-2は、乾癬性の表皮で上昇し、そして「ソリアスタチン(psoriasisatin)1」および「ソリアスタチン2」と呼ばれる乾癬マーカーとして開示される (WO 97/14425)。別の関連するセルピンであるハーピンもまた、乾癬性皮膚病変で過剰発現され、そして肺腫瘍抗原として開示されている (WO 99/47674)。ハーピンは、正常な口粘膜組織、皮膚および培養角化細胞で発現されるが、口腔の扁平上皮癌では過少発現される (Springら、1999)。ボマピンは、骨髄で特異的に発現される (RiewaldおよびSchleef, J Biol Chem 270:26754-57(1995))。

20

30

【0023】

多様なセルピンが体の多くの組織で発現される(例えばWorrallら、1999を参照されたい)。血液に高濃度で存在するものは、一般的に肝臓で合成される。例えばPAI-2およびLEIは、単球で発現される。マスピンは、正常な乳房上皮で発現される (Sagerら、1997)。SCCA-1およびSCCA-2は、正常および悪性扁平上皮で発現され、特に表皮の有棘(spinous)層および顆粒層で、そして子宮腔部上皮の中間層で発現される (Suminamiら、1998)。

40

【0024】

セルピンおよびその標的に仲介される状態および疾患に対して、より有効な治療を発展させるため、セルピン・ポリペプチドファミリーの同定されていないメンバーに関する、より多くの情報が必要である。

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

(発明の概要)

本発明は、サイピン(従来「エピピン(epipin)」とも称された)を含む、新規ヒト・セルピン・ファミリーメンバーの発見に基づく。サイピン遺伝子は、染色体18q21.3の関連セルピン・ファミリーメンバーのクラスター内に位置する。セルピンの中で、サイピンは、SCCA-1、SCCA-2およびハーピンに最も近く関連し、これらはすべて、乾癬組織で発現される。

【0026】

本発明は：

10

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列；

(b) 少なくとも20の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a)のアミノ酸配列の断片；

(c) 少なくとも30の隣接するアミノ酸を含んでなる、(a)のアミノ酸配列の断片；

(d) サイピン・ポリペプチド活性を有する(a)~(c)のいずれかのアミノ酸配列の断片；

(e) 配列番号2のアミノ酸374~395を含んでなる、(a)~(c)いずれかのアミノ酸配列の断片；

(f) 少なくとも20アミノ酸を含んでなり、そして(a)~(e)のいずれかのアミノ酸配列とアミノ酸同一性を共有するアミノ酸配列であって、アミノ酸同一性パーセントが：少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、少なくとも99%、そして少なくとも99.5%からなる群より選択される、前記アミノ酸配列；

20

(g) (f)のアミノ酸配列であって、(f)の前記アミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが、(a)~(e)のいずれかのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドにも結合する抗体に結合する、前記アミノ酸配列；および

(h) サイピン・ポリペプチド活性を有する、(f)または(g)のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、から本質的になる、またはより好ましくは、を含んでなる、単離サイピン・ポリペプチドを提供する。

【0027】

好ましくは、こうしたポリペプチドは、単離サイピン・ポリペプチド、またはサイピンの変異体である単離ポリペプチドである。本明細書において、「変異体」は、ポリペプチドの療法的、抗原性および/またはプロテアーゼ阻害特性が保持されるように、保存的置換および/または修飾でのみ、配列番号2のアミノ酸配列と異なるポリペプチドである。好ましい態様において、こうした置換または修飾は、サイピンRSL(配列番号2のアミノ酸374~395)に関与せず、そして5又はそれより少ないアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2に定義されるポリペプチドと異なる。好ましいサイピン変異体は、配列番号2と95%以上のアミノ酸配列同一性を共有する。

30

【0028】

本発明の他の側面は、本発明のポリペプチドをコードする単離核酸、および少なくとも15ヌクレオチドの長さを有し、中程度のストリンジェンシー条件下で、本発明のポリペプチドをコードする核酸の相補体にハイブリダイズする単離核酸、例えば配列番号1に示すヌクレオチド配列などである。さらに他の態様において、核酸は、非常にストリンジェントな条件下で、配列番号1の相補体にハイブリダイズする。本発明の好ましい態様において、こうした核酸は、サイピン・ポリペプチド活性を有するポリペプチドをコードするか、または配列番号1のヌクレオチド配列とヌクレオチド配列同一性を共有するヌクレオチド配列を含んでなり、ヌクレオチド配列同一性パーセントが：少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、少なくとも99%、そして少なくとも99.5%からなる群より選択される。こうした核酸は、好ましくはサイピン、サイピン変異体、またはその抗原性断片をコードする。やはり含まれるのは、染色体18qにin situハイブリダ

40

50

イゼーションするためのプローブとして使用する、少なくとも長さ15ヌクレオチドの配列番号1のセグメントである。本発明はまた、本発明の核酸に対応する単離ゲノム核酸も提供する。

【0029】

本発明にさらに提供されるのは、本発明の核酸を少なくとも1つ含んでなる発現ベクターおよび組換え宿主細胞、並びに前記核酸が宿主細胞ゲノムに組み込まれている、好ましい組換え宿主細胞である。他の態様において、ベクター核酸は組み込まれない。

【0030】

やはり提供されるのは、本発明の核酸にコードされるポリペプチドを産生する方法であって、前記ポリペプチドの発現を促進する条件下で、組換え宿主細胞を培養することを含んでなり、ここで組換え宿主細胞が本発明の核酸を少なくとも1つ含んでなる、前記方法である。本発明に提供される好ましい方法は、前記ポリペプチドを精製することをさらに含んでなる。本発明の別の側面において、前記方法によって産生されるポリペプチドが提供される。

10

【0031】

本発明のさらなる側面は、本発明のポリペプチドと特異的に結合する、単離抗体、好ましくはモノクローナル抗体、やはり好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体であり、そして好ましくは前記ポリペプチドの活性を阻害する、前記抗体である。

【0032】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドの阻害剤を設計する方法であって、こうしたポリペプチドいずれかの三次元構造を決定し、基質のありうる結合部位の三次元構造を解析し、予測される反応部位を取り込む分子を合成し、そして該分子のポリペプチド阻害活性を決定する工程を含んでなる、前記方法を提供する。

20

【0033】

本発明のさらなる側面において、サイピン・ポリペプチド活性を改変する化合物を同定する方法であって：

(a) 本発明のポリペプチドと試験化合物を混合し；そして

(b) 試験化合物が前記ポリペプチドのサイピン・ポリペプチド活性を改変するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

30

【0034】

本発明の別の側面において、サイピン・ポリペプチドの結合活性を阻害する化合物を同定する方法であって：

(a) 本発明のポリペプチドおよび前記ポリペプチドの結合パートナーと試験化合物を混合し；そして

(b) 試験化合物が前記ポリペプチドの結合活性を阻害するかどうかを決定する

ことを含んでなる、前記方法を提供する。

【0035】

本発明はまた、本発明のポリペプチドおよび前記ポリペプチドのアゴニストからなる群より選択される化合物を、少なくとも1つ提供することを含んでなる、プロテアーゼ阻害活性を増加させる方法も提供し；該方法の好ましい態様は、本発明のポリペプチドを少なくとも1つ投与することによって、患者において前記活性を増加させることをさらに含んでなる。

40

【0036】

本発明がさらに提供するののは、本発明のポリペプチドのアンタゴニストを少なくとも1つ提供することを含んでなる、プロテアーゼ阻害活性を減少させる方法であって；該方法の好ましい態様は、本発明のポリペプチドのアンタゴニストを少なくとも1つ投与することによって、患者において前記阻害活性を減少させることをさらに含んでなり、そしてさらに好ましい態様では、アンタゴニストは、前記ポリペプチドいずれかの活性を阻害する抗体である。

50

【 0 0 3 7 】

本発明はさらに、サイピンおよびその標的に仲介される状態および疾患を治療する方法であって、本発明のポリペプチド、および前記ポリペプチドのアゴニストからなる群より選択される化合物を少なくとも1つ投与することを含んでなる、前記方法を提供し；好ましい態様において、サイピンまたはその標的に仲介される状態または疾患は、肺気腫、肝硬変、肝炎、凝血障害（血栓症を含む）、腫瘍形成、および腫瘍転移または浸潤より選択される。

【 0 0 3 8 】

本発明の他の側面において、サイピンおよびその標的に仲介される状態および疾患を治療する方法であって、本発明のポリペプチドのアнтаゴニストを投与することを含んでなる、前記方法を提供し；好ましい態様において、サイピンまたはその標的に仲介される状態または疾患はウイルス病原性である。

10

【 0 0 3 9 】

本発明のさらなる態様は、サイピンおよびその標的に仲介される状態および疾患を治療するための医薬品調製における、本発明のポリペプチドの使用を提供し；好ましい態様において、サイピンまたはその標的に仲介される状態または疾患は、肺気腫、肝硬変、肝炎、凝血障害、腫瘍形成、および腫瘍転移または浸潤より選択される。

【 0 0 4 0 】

本発明のさらなる態様は、サイピン機能障害と関連する医学的状态を治療するための医薬品調製における、本発明のポリペプチドの使用を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 4 1 】

（発明の詳細な説明）

我々は、新規セルピン・ポリペプチドであって、このポリペプチドファミリーに特徴的な構造特性を有する、サイピン（先に「エピピン」と名づけられた）を同定した。サイピンのスプライシング変異体、S E R P I N B 1 2（ユコピン（Y u k o p i n）とも呼ばれる）は、G e n B a n k 寄託番号 A F 4 1 1 1 9 1 として公表されている。代表的なヒト・サイピン・ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に提供し、そしてこのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を配列番号2に提供する。サイピンおよびセルピン・ポリペプチド間の配列類似性を示す並列を、以下の実施例1の表2に提示する。アミノ酸配列相同性、予測される三次構造相同性、および染色体18局在からサイピンがオブ・セルピンであることが明らかである。既知のセルピンのうち、サイピンに最も近く関連するのは S C C A - 2 であり、S C C A - 2 とサイピンは約 5 1 % のアミノ酸配列相同性を共有する。サイピンのマウス相同体（h o m o l o g u e）は、G e n B a n k 寄託番号 A K 0 0 9 0 1 8 を有する。マウス・サイピン（A K 0 0 9 0 1 8）は、オブ・セルピン・クラスター中、マウス染色体1に局在し、該クラスターは、S e r p i n b 2、S e r p i n b 5 および S e r p i n b 7 の既知のマウス・オブ・セルピン遺伝子を含む（以下の実施例7を参照されたい）。

30

【 0 0 4 2 】

サイピンは、他のオブ・セルピンに見られるものと類似のドメインを含有する（R e m o l d - O ' D o n n e l l、1 9 9 3 を参照されたい）。これらの1つがアミノ末端近傍に位置する疎水性領域である。この疎水性領域は、切断はされないが、細胞外空間に侵入するセルピンのシグナル配列として役立つ。サイピンは、こうした疎水性領域を所持し、これは H e i j n e の方法（N u c l e i c A c i d s R e s 1 4（1 1）：4 6 8 3 - 4 6 9 0（1 9 8 6））にしたがって、シグナル配列と同定された。予測されるサイピン・シグナル配列は、既知のオブ・セルピン・シグナル配列とよく並列し、そして配列番号2のアミノ酸28～42に渡る。大部分の他のオブ・セルピンと比較して、サイピンは、配列番号2のほぼアミノ酸61～107に位置する挿入を有する。この領域は、2つの保存されるらせん間に存在するため、らせん間可変ループ領域と同定される（R e m o l d - O ' D o n n e l l、1 9 9 3 を参照されたい）。他のセルピンでは、らせん間

40

50

可変ループは、長さおよびアミノ酸組成において、非常に多様である。サイピンでは、この領域は挿入のため異常に長い、この状況は規範的なセルピン・フォールディングに干渉しない。サイピン挿入は、2つの保存されるオブ・セルピンらせん（らせんCおよびらせんD）間に位置する。PAI-2もまた、この同じ位置に巨大な挿入を有する。配列番号2のアミノ酸61～107の挿入はまた、トランス・グルタミン化（transglutamination）部位である可能性がある、配列番号2のアミノ酸82～101のサイピンに特異的な20のアミノ酸を除き、SERPINB12/ユコピンにも存在する。AK009018ネズミ・サイピン・ポリペプチドはまた、サイピン特異的な潜在的トランス・グルタミン化残基も含む。サイピンおよびユコピン間の相違は、イントロンCにおいて、異なる5'スプライシング部位を使用することから生じ；3'スプライシング部位は同一である。イントロンCのサイピン5'スプライシング部位は、配列番号1のヌクレオチド303の後に位置し；ユコピンはエクソン2内の60ヌクレオチド上流の5'スプライシング部位（配列番号1のヌクレオチド243および244の間）を用い、脊椎動物スプライシング部位の8%で見られる、非典型的なエクソン側最終アデニンを持つ（Padgettら, 1986, Ann Rev Biochem 55:1119-1150）：AAA/gtgctg（配列番号1のヌクレオチド241～249）。SERPINB13変異体がC-Dらせん間ループにおける挿入を含んで記載されてきたように、オブ・セルピンでは、選択的スプライシングの先例がある（Springら, 1999, Biochem Biophys Res Comm 264:299-304）。イントロン/エクソンスプライシング部位フェーシング（phasings）は、オブ・セルピンにおいて保存され、そしてセルピン・スーパーファミリーメンバーの進化的関連性を予測するのに用いられてきている。オブ・セルピンは、保存部位に存在する6つのイントロンを有する（A、B、D、E、F、およびG）。オブ・セルピンのサブセットに見られるイントロンCは、C-Dらせん間ループに位置し、そして正確な位置はセルピン間で保存されない。サイピンは、C-Dらせん間ループにおいて、高い比率のグルタミンを所持する（予測値6.2%に比較して、5/47または10.6%（McCaldonおよびArgos, 1988, Proteins 4:99-122；ネズミ・サイピンは、C-Dらせん間ループにおいて、6/45または13.3%のグルタミンを有する）。ユコピンにおける欠失は、ヒト・サイピンに存在する5つのグルタミンのうち3つを除去する。サイピンおよびユコピン間のこの相違が、トランス・グルタミン化によって架橋される能力の機能的な相違を生じる可能性がある」と推測すると興味深い。

10

20

30

【0043】

超可変領域から移動するとCOOH末端に向かって、オブ・セルピンは、比較的高い割合の保存がある領域を所持する。サイピンにおいて、この領域は、配列番号2のほぼアミノ酸108～アミノ酸373に広がる。この比較的保存された領域は、本明細書において「構造的コア」領域と称する。セルピンRSLは、構造的コア領域を過ぎて、さらにCOOH末端寄りに位置する。アミノ酸相同性に基づいて、サイピン中のRSLは、長さおよそ22アミノ酸であり、そして配列番号2のアミノ酸374～395に広がる。既知のセルピンのタンパク質分解切断部位の命名慣例によると、アミノ酸残基374はP17アミノ酸、そしてアミノ酸395はP5'である。これらの指定は、390位（P1）のアルギニンおよび391位（P1'）のセリン間に切れやすい結合を置く。標的プロテアーゼによる切断は、P1およびP1'間で生じると予測される。RSLに続いて、セルピン・ファミリーメンバーは、非常に保存されるセルピン・サインモチーフを含有する。サイピン・アミノ酸は、配列番号2の残基398～408間で、このセルピン・サインモチーフとマッチする。したがって、前述の構造的特徴は、サイピン・ポリペプチドが、他のオブ・セルピンと一致する全体の一次構造を有することを示す。

40

【0044】

当業者は、上述のサイピン・ポリペプチド領域の境界はおおよそそのものであり、そしてこうしたドメインの正確な境界はまた、セルピン・ポリペプチドファミリー内のメンバー間で異なる可能性があることを認識するであろう。

50

【0045】

セルピン構造的ファミリーのメンバーとして、サイピンの分類をさらに確立するため、クエリータンパク質配列をタンパク質データベース(PDB)(Jaroszewskiら, Prot Sci 7:1431-40(1998))の構造的代表に重ねる、タンパク質スレッディングプログラムであるGeneFold(Tripes, Inc., ミズーリ州セントルイス; Bermanら, Nucleic Acids Res 28:235-242(2000))に、サイピン配列を提出した。セルピン・ファミリーメンバーは、その多様性にもかかわらず、GeneFoldなどのタンパク質スレッディングアルゴリズムを用いることにより、一次アミノ酸配列から予測可能な、非常に特徴的な三次元構造によって特徴付けられる。タンパク質ファミリーの新規メンバーを分類するのにGeneFoldを使用するため、新規タンパク質配列をプログラムに入力し、その後、GeneFoldデータベースに存在する、あらかじめ知られているタンパク質構造(「テンプレート」構造)にどのくらいよくフォールディングするかを反映する確率スコアに割り当てる。スコア決定のため、GeneFoldは、一次アミノ酸配列類似性、残基の埋没(burial)パターン、局所相互作用および二次構造比較に頼る。GeneFoldを用いる際、いくつかのセルピンに関して解明された構造を含む、タンパク質フォールディングのあらかじめ存在するデータベース中のテンプレート構造すべての上に、アミノ酸配列をフォールディング(またはスレッディング)する。各比較のため、プログラムはまず、最適並列を決定し、そしてその後、並列のこの度合いが偶然生じる可能性(P値)を計算する。各テンプレート構造上にスレッディングしたクエリー配列に関して、P値の逆数を決定し、そしてこのP値逆数をスコアとして報告する。各ヒットに関して、3つの異なるスコアを実際に計算し、そして3つの欄で報告する。これらの3つのスコアは(i)配列のみ;(ii)配列プラス局所コンホメーション優先性プラス埋没条件;および(iii)配列プラス局所コンホメーション優先性プラス埋没条件プラス二次構造に基づく。上記のスコアすべてに関して、各カラムの関連するテンプレート識別番号と共に、指定された切り捨て値を戻す。したがって、これらのスコアは、新規タンパク質が多様な参照構造とマッチする度合いを反映する。したがって、スコアは、新規タンパク質を既知のタンパク質ファミリーのメンバーに割り当てるのに有用である。GeneFoldを用いた、ありうる最高のスコアは999.999である。GeneFoldプログラムにスレッディングした際、オブ・セルピンLEI(SwissProt第P30740号)、PAI-2(GenBank第XP_008746号)、SERPINB10(ボマピン)(GenBank第NP_005015号)、SCCA-1(SwissProt第P29508号)、SCCA-2(SwissProt第P48594号)およびプロスタピン(GeneSeq第Y15156号)はすべて、上位5ヒットに比較して、3つの欄すべてで999.99のスコアを有した。各場合で、上位5ヒットはすべてセルピンであり、したがって、この群のタンパク質間で、高い度合いの構造的保存が例示される。

【0046】

GeneFoldデータベース中のすべての構造に対してスレッディングした後、サイピンは、GeneFoldデータベース中の5つの異なる既知のセルピンとの3種類のスコアすべて(すなわち3つの欄すべて)で、999.99をスコアした。GeneFoldに列挙される順に、PDBヒットは:1ovaA(オボアルブミン)、1hleA(ウマ白血球エラスターゼ阻害剤)、2antI(アンチトロピン)、1atu(アルファ-1-アンチトリプシン)、および1as4A(アンチキモトリプシン)であった。GeneFoldの結果は、サイピンがセルピンであるという明らかな指摘を提供する。しかし、1ovaAに対する並列を抜粋すると、サイピンらせん間可変ループ領域に存在する巨大挿入が示される(配列番号2のアミノ酸80~111)。Chemical Computing Group(1010 Sherbrooke St W, Ste 910, Montreal, Quebec, Canada H3A 2R7)の分子操作環境(MOE)を用いて、挿入を1ovaA構造上にマッピングし、そして二次構造要素から単離されるループ上に見出す。サイピンをセルピンとしてフォールディングするに

は、単純なループ伸長しか必要でない。

【0047】

正常な生物活性を持つアリル変異体 (a l l e l i c v a r i a n t) または生物活性が改変された突然変異体などの、本発明にしたがったサイピン変異体を、GeneFoldを用いて解析すると、得られる上位5ヒットはセルピンであり、そして上位5ヒットのスコアは999.999であろう。999.999のスコアは、GeneFoldに報告される3種類のスコア、すなわち、配列のみ、配列プラス局所コンホメーション優先性プラス埋没条件、または配列プラス局所コンホメーション優先性プラス埋没条件プラス二次構造のいずれかを用いて、これらの5ヒットに関して得られるであろう。こうしたサイピン変異体は、他の既知のセルピンからサイピンを差別化する、特定のアミノ酸配列を含有するため、他のセルピンとは区別される。他のセルピンからサイピンを差別化する特定の

10

【0048】

GenBank dbESTデータベースの部分的ヒトcDNAクローン (A A 2 4 2 9 6 9) は、配列番号2に示すサイピン・ポリペプチドのアミノ酸69～250に95%の同一性を有するタンパク質を予測する、オープンリーディングフレームを含有する。このESTがコードするポリペプチドは、したがって、上に論じるサイピン挿入 (配列番号2のアミノ酸61～107) を含み、そしてサイピン構造的コア (配列番号2のアミノ酸108～373) を部分的に含む。このESTタンパク質は、サイピンと8アミノ酸残基異なり、これは、配列番号2のアミノ酸109、115、118、126、127、216、246および248の位に対応する。これらの部位でESTに存在するアミノ酸は、それぞれ、スレオニン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニン、アルギニン、イソロイシン、プロリンおよびフェニルアラニンであり、一方、サイピンでは、対応するアミノ酸は、それぞれ、セリン、チロシン、グルタミン、イソロイシン、リジン、リジン、グルタミンおよびチロシンである。本発明の1つの態様は、配列番号2と約95%以上のアミノ酸配列同一性を有し、そしてさらに以下の少なくとも1つを所持するサイピン変異体を含む：残基109のセリン；残基115のチロシン；残基118のグルタミン；残基126のイソロイシン；残基216または246のリジン；残基246のグルタミン；または残基248のチロシン。最適には、これらのサイピン変異体は、プロテアーゼ阻害活性を所持するであろう。EST AA242969によって予測されるポリペプチドは、RSLを欠き、したがってセルピン構造にフォールディング不能であるし、またサイピンのプロテアーゼ阻害活性を示すのも不能であることに注目しなければならない。

20

30

【0049】

核酸配列解析は、サイピンがオブ・セルピンであるという結論をさらに支持する。サイピン遺伝子は、NCBIヒト染色体コンティグAC019355、AP001404およびAC015536上の染色体18に位置決定されてきている。これらのコンティグは、サイピンおよびハーピン両方のゲノム配列を含有し、したがってその連鎖を示す。ハーピンの放射ハイブリッド (r a d i a t i o n h y b r i d) マッピングは、この遺伝子を、オブ・セルピン・クラスターに隣接する染色体18q21.3/18q22に位置決定する (S p r i n g ら、1999)。サイピンのゲノム配列解析は、そのイントロン・スプライシング部位結合部が、他のセルピン・スーパーファミリーメンバーとオブ・セルピン・ファミリーメンバーを区別する特徴である、オブ・セルピン・ファミリーメンバーに保存されるエクソン・イントロン境界にマッチすることを示す (R e m o l d - O ' D o n n e l l、1993)。

40

【0050】

50

プロテアーゼを阻害するセルピンは、1またはいくつかのプロテアーゼに特異的である傾向がある。阻害性セルピンは、その標的プロテアーゼと1:1化学量論の熱および変性耐性複合体を形成する。RSLは、阻害性セルピンの重要な構造的決定要因である。Aシートかららせん開始に導くペプチドストークの配列は、ヒンジ領域(P15 - P9)として知られ、阻害性セルピンで非常に保存され、そしてこの領域における突然変異は、阻害活性の喪失を生じる可能性がある(HuberおよびCarrell, *Biochemistry* 28:8951(1989); Potempaら、1994)。ヒンジ領域内で、P12 - P9は、小側鎖を持つ残基の優勢を示し、これらの残基は通常、アラニンまたはグリシンである(Steinら、*Nature* 347:99 - 102(1990))。Steinらは、このアラニンリッチ領域が、ストークの柔軟性に寄与し、そしてストークの可動性が阻害活性に必要であると提唱する。サイピンのヒンジ領域(配列番号2のアミノ酸376 ~ 382に対応する)は、Potempaらが解析した40の阻害性セルピンのコンセンサスにマッチし(Potempaら、1994)、アラニンリッチストークにおける4つの連続するアラニン(配列番号2のアミノ酸379 ~ 382)を含み、したがってサイピンが阻害性セルピン・サブファミリーのメンバーであることを示す。

10

20

30

40

50

【0051】

RSLのP1位中のアミノ酸に基づいて、どの種類のプロテアーゼがセルピンによって阻害されるかを予測することが可能である。サイピンはP1にアルギニンを有し、したがって、1以上のアルギニン切断プロテアーゼを阻害する可能性があることが示される。この予測と一致して、組換えユコピンは、トリプシン様セリンプロテアーゼの阻害剤である(Askewら、2001, *J Biol Chem* 276:49320 - 49330)。C-Dらせん間ループがプロテアーゼ阻害活性に役割を果たしているようではないため、サイピンは、ユコピンと同じ*in vitro*活性を有するであろうと期待される(ヒトおよびマウス・サイピン相同体間の興味深い相違は、マウスRSLがアルギニンの代わりにP1リジンをもつことである)。多くのアルギニン切断プロテアーゼがヒト血清および組織に存在する。P1にアルギニンを有する阻害性セルピンには、uPAおよびtPAを標的とするPAI-1、uPAおよびtPAを標的とするPAI-2、セリンプロテアーゼ、トロンピンを標的とするアンチトロンピン、並びにC1エステラーゼを標的とするC1阻害剤が含まれる(Whissstockら、1998を参照されたい)。サイピンによる不活性化の潜在的な療法的標的である、P1アルギニン特異性を持つセリンプロテアーゼには、限定されるわけではないが：トリプシン、トリプターゼ、カリクレイン、トニン、トロンピン、プロテインC、uPA、tPA、プラスミン、凝固因子VIIa、IXa、Xa、XIaおよびXIIa、補体因子1、BおよびD、補体構成要素C1およびC2、グランザイムAおよびK、ヘプシン、プロスタシン、フォリプシン、アクロシン、および肝細胞増殖因子アクチベーターが含まれる。

【0052】

組織特異的cDNAライブラリーからのPCR増幅を行って、サイピンcDNA配列を検出した。これらの実験の結果によって、サイピン転写物が非常に多様な胎児細胞および成人細胞で発現することが示され、これらには以下が含まれた：気管支上皮；前立腺上皮；乳房上皮；および小気道上皮。さらに、サイピンは以下の上皮組織で発現される：前立腺；精巣；胸腺；扁桃腺；皮膚；角化細胞；頸管；胎児小腸；および食道。さらに、サイピンは、以下の癌腫および形質転換細胞株で発現される：肺上皮癌腫(A549)；B細胞リンパ腫(Akata、Nalm6、Namalwa)；単球起源の癌細胞(U937、Thp-1、AML5)；および腫瘍異種移植片(結腸、膵臓、前立腺)。サイピン発現はまた、肺および食道起源の雑多な腫瘍でも観察された。サイピン配列を増幅するのに用いたプライマーは、ユコピンcDNAもまた増幅するはずであったが、100を超える、異なる組織cDNAのPCR検査で、20アミノ酸(60ヌクレオチド)相違と一致するサイズ多型は同定されなかった。これは、アガロースゲル分解能の限界から、または我々が調べた組織ではユコピンmRNAが欠如していたことから生じる可能性があった。我々はらせん間ループを通じて、異なる組織由来の9つのPCR産物の配列を決定し、そして

本明細書に記載するサイピン配列しか同定しなかった。

【0053】

SCCAもまた、正常な扁平上皮組織（例えば舌、扁桃腺、食道、胸腺のハッサル小体、および皮膚）で発現され、これはサイピンに関して本明細書で観察される発現パターンと類似である。また、SCCAは、頸管、肺および食道の扁平上皮癌で上昇している。サイピンもまた同様に、癌腫組織（すなわちGI112結腸腺癌）で発現される。SCCA1およびSCCA2はどちらも、乾癬性表皮で上昇している（WO 97/14425を参照されたい）。別の関連セルピン、ハーピンもまた、乾癬性皮膚病変で過剰発現されており、そして肺腫瘍抗原として記載されている（WO 99/47674）。

【0054】

サイピン発現の上述のパターンは、関連するSCCA-2と同様、サイピンの正常な発現が、主に、扁平上皮が豊富な組織に限定されており、したがってサイピンは、上皮組織のマーカーとして、例えば、組織学的調製において、上皮細胞にタグ付けするための上皮特異的抗体を提供する際に、または上皮起源細胞が腫瘍生検に存在するかどうか決定するために、役立つ可能性がある。

【0055】

いくつかの癌では、通常は細胞内にあるセルピンは、二重位相分布を装うであろう。こうしたセルピンの例はSCCA-2であり、SCCA-2は、扁平上皮癌などの病理学的状態と関連してのみ、細胞外区画に多量に存在する。同様に、最初の細胞内位置から二重位相細胞内/細胞外位置へのサイピンの再分布は、特定の種類の癌の示標を提供する可能性がある。Bird(1998)はまた、PAI-2では細胞内型が最も豊富な型である一方、妊娠、炎症および悪性腫瘍中、分泌型レベルが増加することにも注目する。

【0056】

SCCA-1およびSCCA-2同様、サイピンは乾癬マーカーとして有用である可能性があり、またはマスピン同様、サイピンは腫瘍抑制因子として有用である可能性がある。さらに、サイピン発現または活性の変調は、血管止血を制御するのに、肺気腫または嚢胞性線維症を治療するのに、あるいは冠動脈バイパス術の合併症を防止するのに、使用を見出す可能性がある。

【0057】

上皮細胞株およびThp-1細胞株において、サイピン発現は、腫瘍プロモーター、ホルボールミリスチン酸(PMA)での誘導に反応して、またはエルシニア・エンテロリティア(Yersinia enterocolytia)での感染によって上昇するようである。後者の知見は、増加したレベルのサイピン転写物の検出または感染組織における増加したレベルのサイピン・タンパク質の検出が、エルシニア感染の迅速な診断法を提供し、したがってエルシニア種に引き起こされる疾患の管理を補助することが可能であると示す。こうした疾患にはペスト(plague)および下痢が含まれる。また、増加したサイピン発現の検出は、組織がPMAなどの腫瘍プロモーターに曝露されたことがあるかどうかを決定する診断法として役立つ可能性がある。

【0058】

上述に加え、プロテアーゼ-サイピン複合体は、好中球および単球の化学誘引物質として役立つ可能性がある。

以下の実施例5に記載するように、サイピン遺伝子は、ヒト染色体18q21.3にマッピングされる。したがって、配列番号1に示すサイピン・ヌクレオチド配列は、ヒト染色体の組織学的調製において、染色体18q21.3にタグ付けする有用なツールを提供する。サイピン・プローブを用いる、こうした方法は、腫瘍生検中の細胞を解析して、染色体18のこの位置に破壊点またはヘテロ接合性の喪失があったかどうかを決定するための診断ツールとして役立つ可能性がある。こうした知識は、多様な治療オプションに対する患者の反応を予測するのに有用である可能性がある。染色体へのin situハイブリダイゼーションのための方法が当該技術分野に知られ、そして典型的には、スライドに固定され、そして染色体DNAを変性するように処理されている、染色体に存在する標的配

10

20

30

40

50

列と安定な核酸二重鎖を形成するのに十分な長さを持つ標識プローブを使用する。この目的に適したプローブは、配列番号1のヌクレオチド配列に対応し、そして長さ少なくとも15ヌクレオチドであり、そしてより好ましくは長さ30ヌクレオチド以上である。

【0059】

サイピン・ポリペプチドと関連する、典型的な生物学的活性または機能には、プロテアーゼの阻害が含まれる。サイピンは、血清、細胞外マトリックスまたは細胞内空間に見られる1以上のプロテアーゼを阻害するようである。プロテアーゼ阻害活性は、サイピン・ポリペプチドのRSLドメイン(配列番号2のアミノ酸376~395)と関連する。したがって、RSL活性が必要な使用のため、好ましいサイピン・ポリペプチドには、サイピンRSLドメインを有し、そして血清または細胞外マトリックスに存在するプロテアーゼを阻害する能力を示すものが含まれる。

10

【0060】

好ましいサイピン・ポリペプチドは、サイピンRSLを含んでなり、そして配列番号2に示すアミノ酸配列を持つサイピン・タンパク質の特異的プロテアーゼ阻害能を保持する。サイピン・ポリペプチドのプロテアーゼ阻害活性は、例えば、損なわれていない細胞外マトリックスタンパク質または損なわれていない血清タンパク質と精製組換えサイピンのインキュベーションから生じるポリペプチド断片の放出を測定するアッセイにおいて、測定可能である。あるいは、サイピン・プロテアーゼ阻害活性は、サイピンRSLを有する標識精製組換えセルピンを、血清タンパク質または細胞外マトリックスタンパク質とインキュベーションし、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下で、混合物を煮沸し、その後、産物を解析して、標的プロテアーゼと安定な熱耐性複合体を形成したサイピンと一致する変化を、サイピンが経たかどうかを決定することによって、検出可能である。例えば、RiewaldおよびSchleef、1995に記載されるように、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いることによって、煮沸した混合物を解析可能である。こうして同定したサイピン-プロテアーゼ複合体をさらに解析して、プロテアーゼの同一性を決定可能である。血清タンパク質または細胞外マトリックスタンパク質の混合物を用いる代わりとして、アッセイは、近く関連するセルピンと複合体を形成することが知られる特定のプロテアーゼを使用することが可能である。こうしたプロテアーゼには、限定されるわけではないが：トリプシン、トリプターゼ、カリクレイン、トニン、トロンビン、プロテインC、uPA、tPA、プラスミン、凝固因子VIIa、IXa、Xa、XIaおよびXIIa、補体因子1、BおよびD、補体構成要素C1およびC2、グランザイムAおよびK、ヘプシン、プロスタシン、フォリプシン、アクロシン、および肝細胞増殖因子アクチベーターが含まれる。

20

30

【0061】

プロテアーゼ阻害活性を示すため、サイピンRSLは、構造最上部のループにおけるRSLの提示を確実にするセルピン三次構造を有するセルピン分子中に存在しなければならない。したがって、活性を示すため、サイピンRSLは、損なわれていないサイピン分子中に存在しなければならない、または異なるセルピン分子を操作して、その天然RSLの代わりにサイピンRSLを用いることが可能である。

【0062】

したがって、プロテアーゼ阻害活性を必要とする使用のため、好ましいサイピン・ポリペプチドには、RSLドメイン(配列番号2のアミノ酸374~395)を有し、そして血清タンパク質または細胞外マトリックスタンパク質と熱耐性複合体を形成可能なものが含まれる。サイピン・ポリペプチドのプロテアーゼ阻害活性は、例えば、サイピン-プロテアーゼ複合体を測定するアッセイにおいて、または天然標的であるタンパク質を切断する標的プロテアーゼの能力を測定するアッセイにおいて、測定可能である。サイピン・ポリペプチドファミリーの個々のメンバー、並びにこれらのポリペプチドの断片および他の誘導体がこれらの活性を示す度合いは、標準的アッセイ法、特にクロマトグラフィーおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動などのアッセイによって、決定可能である。

40

【0063】

50

サイピン・ポリペプチドの生物学的活性の別の側面は、サイピン特異的抗体、標的プロテアーゼ、または通常、サイピンと相互作用する他の生物学的分子いずれかなどの特定の結合パートナーに結合する、このポリペプチドファミリーメンバーの能力である。用語「結合パートナー」は本明細書において、標的プロテアーゼ、リガンド、受容体、基質、抗体、並びに結合パートナーおよびサイピン・ポリペプチドの特定の部分間の接触または近接を通じて、サイピン・ポリペプチドと相互作用する他の分子いずれかを含む。サイピン・ポリペプチドの R S L ドメインが、結合パートナー（類）に対するサイピン結合特異性を決定するため、R S L ドメインは、サイピン・ポリペプチドの残りとは別個の断片として、または例えば免疫グロブリン F c ドメインに融合させた可溶性ポリペプチドとして発現させた際、サイピン・ポリペプチドがその結合パートナーに結合するのを妨げ、したがって、天然標的（類）へのサイピン・ポリペプチドの結合を介して仲介される生物学的活性を阻害可能である可能性がある。サイピン・ポリペプチドおよびその結合パートナー間の結合を検出するかまたは測定する、適切なアッセイには、上述のクロマトグラフィーアッセイが含まれる。

10

【0064】

セルピン・ポリペプチドは、多様な疾患または状態に関与する。こうした疾患は、問題のセルピンの過剰発現、またはこのセルピンの異常な型の発現を伴う可能性がある。サイピン・ポリペプチドファミリーメンバーおよびその標的プロテアーゼまたは他の結合パートナー、および/または他の相互作用ポリペプチド間の相互作用を遮断するかまたは阻害することが、本発明の側面であり、そしてこれはサイピン・ポリペプチド活性の阻害剤の使用を通じて、これらの疾患および状態を治療するかまたは寛解させる方法を提供する。あまりにもわずかのサイピン・ポリペプチド活性を伴う状態には、これらの状態を治療するかまたは寛解させる方法は、単離サイピン・ポリペプチドまたは活性断片を提供することによって、あるいは内因性または外因性サイピン・ポリペプチドを活性化する化合物（アゴニスト）を提供することによって、サイピン・ポリペプチドの量または活性を増加させることを含んでなる。治療が必要な生物、例えば哺乳動物または最も好ましくはヒトにサイピン・ポリペプチドを投与する好ましい方法は、局所または全身投与、注入、緩慢放出移植、エアロゾル吸入を含み、そしてサイピンのポリエチレングリコール誘導体を伴うことが可能である。

20

【0065】

サイピン・ポリペプチドのさらなる使用には、局所的に上昇したサイピン発現によって、またはサイピン血清レベルの上昇によって特徴付けられる癌の診断試薬としての使用が含まれる。

30

【0066】

サイピン・ポリペプチド

サイピン・ポリペプチドは、当業者によって、特定の構造ドメインを共有する可能性があり、そして/または配列番号2のサイピン・ポリペプチドと共通の生物学的活性を有する可能性があり、そして/または他のサイピン・ポリペプチドにも特異的に結合する抗体に結合する可能性があるポリペプチドと同定される、配列番号2のサイピン・ポリペプチドに十分な度合いのアミノ酸同一性または類似性を共有するポリペプチドである。サイピン・ポリペプチドは、天然存在供給源から単離可能であるし、あるいは天然存在サイピン・ポリペプチドと同一の構造を有するか、または天然存在サイピン・ポリペプチドと異なる構造を有するように産生可能である。いかなる種類の改変（例えば限定されるわけではないが、アミノ酸の挿入、欠失、または置換；ポリペプチドのグリコシル化状態の変化；三次元構造または自己会合状態を変化させるリフォールディングまたは異性化；並びに他のポリペプチドまたは分子との会合の変化）によって、サイピン・ポリペプチドいずれかから派生するポリペプチドもまた、サイピン・ポリペプチドである。したがって、本発明に提供するポリペプチドには、本明細書に記載するサイピン・ポリペプチドのものに類似のアミノ酸配列によって特徴付けられるが、そこに修飾が天然に提供されているかまたは故意に操作されているポリペプチドが含まれる。サイピン・ポリペプチドと共通の生物学的

40

50

活性を共有するポリペプチドは、サイピン・ポリペプチド活性を有するポリペプチドである。

【0067】

本発明は、サイピン・ポリペプチドの全長および成熟型両方を提供する。全長ポリペプチドは、最初に翻訳されるようなポリペプチドの完全一次アミノ酸配列を有するものである。全長ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、cDNA分子の完全オープンリーディングフレーム(「ORF」)の翻訳によって、得ることが可能である。その遺伝子座から、選択的スプライシングによって、または多数の翻訳開始部位の使用によって、多数のmRNA型が産生される場合、単一の遺伝子座に、いくつかの全長ポリペプチドがコードされることが可能である。ポリペプチドの「成熟型」は、シグナル配列の切断またはプロドメインを除去するタンパク質分解的切断などの、翻訳後プロセッシング工程を経たポリペプチドを指す。特定の全長ポリペプチドの多数の成熟型は、例えば、シグナル配列の多数の部位での切断によって、またはポリペプチドを切断するプロテアーゼの差別的制御によって、産生可能である。こうしたポリペプチドの成熟型(類)は、全長ポリペプチドをコードする核酸分子を、適切な哺乳動物細胞または他の宿主細胞において発現することによって、得ることが可能である。ポリペプチドの成熟型の配列はまた、シグナル配列またはプロテアーゼ切断部位の同定を通じて、全長型のアミノ酸配列からも決定可能である可能性がある。

10

【0068】

本発明のサイピン・ポリペプチドはまた、一部切除されている(truncated)が、生物学的に活性であるポリペプチド、例えばポリペプチドの天然存在可溶性型を生じることが可能な、選択的mRNAプロセッシングなどの転写後または翻訳後プロセッシング事象から生じるものも含む。本発明内にやはり含まれるのは、ポリペプチドからの1以上の末端アミノ酸(一般的には約1~5の末端アミノ酸)のタンパク質分解的除去による、異なる種類の宿主細胞における発現に際する、NまたはC末端の相違などのタンパク質分解に起因しうる変異である。

20

【0069】

本発明は、結合する天然パターングリコシル化を含むまたは含まないサイピン・ポリペプチドをさらに含む。酵母または哺乳動物発現系(例えばCOS-1またはCHO細胞)で発現したポリペプチドは、発現系の選択に応じて、分子量およびグリコシル化パターンにおいて、天然ポリペプチドと同様である可能性も、または有意に異なる可能性もある。大腸菌(E.coli)などの細菌発現系での本発明のポリペプチドの発現は、非グリコシル化分子を提供する。さらに、既定の調製は、多数の異なってグリコシル化されたポリペプチド種を含む可能性がある。グリコシル基は、慣用法、特にグリコペプチダーゼを利用するものを通じて、除去可能である。一般的に、本発明のグリコシル化ポリペプチドは、モル過剰のグリコペプチダーゼ(Boehringer Mannheim)とインキュベーションすることが可能である。

30

【0070】

サイピン・ポリペプチドおよびそれをコードする核酸の種相同体もまた、本発明に提供する。本明細書において、「種相同体(species homologue)」は、既定のポリペプチドまたは核酸のものと起源の異なる種であるが、当業者に決定されるように、既定のポリペプチドまたは核酸に有意な配列類似性を持つポリペプチドまたは核酸である。種相同体は、本明細書に提供するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドから、適切なプローブまたはプライマーを作成し、そして所望の種由来の適切な核酸供給源をスクリーニングすることによって、単離し、そして同定することが可能である。本発明はまた、サイピン・ポリペプチドおよびそれをコードする核酸のアリル変異体;すなわち、アミノ酸またはヌクレオチド配列の相違が、遺伝子多型(集団内の個体間のアリル変異体)に起因しうる、こうしたポリペプチドおよび核酸の天然存在型も含む。

40

【0071】

本発明のサイピン・ポリペプチドの断片が本発明に含まれ、そして該断片は直線型であっ

50

ても、または例えば、H. U. Saragoviら, Bio/Technology 10: 773 - 778 (1992) および R. S. McDowellら, J. Amer. Chem. Soc. 114: 9245 - 9253 (1992) に記載されるように、既知の方法を用いて環状化してもよい。本発明のポリペプチドおよびポリペプチド断片、並びにそれらをコードする核酸は、サイピン・ポリペプチドの長さの少なくとも25% (より好ましくは少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、そして最も好ましくは少なくとも80%) のアミノ酸またはヌクレオチド配列長を含み、そして配列同一性が、配列ギャップを最小にしつつ、重複および同一性が最大になるように並列させた際のポリペプチドのアミノ酸配列の比較によって決定される場合、サイピン・ポリペプチドまたはそれらをコードする核酸と、少なくとも60% (より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、または少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%) の配列同一性を有するポリペプチドおよび核酸を含む。本発明にやはり含まれるのは、好ましくは少なくとも8、または少なくとも10、または好ましくは少なくとも15、またはより好ましくは少なくとも20、またはさらにより好ましくは少なくとも30、または最も好ましくは少なくとも40の隣接するアミノ酸を含んでなるセグメントを含有するかまたはコードする、ポリペプチドおよびポリペプチド断片、並びにそれらをコードする核酸である。こうしたポリペプチドおよびポリペプチド断片はまた、配列同一性が、配列ギャップを最小にしつつ、重複および同一性が最大になるように並列させた際のポリペプチドのアミノ酸配列の比較によって決定される場合、サイピン・ポリペプチドいずれかのこうしたセグメントいずれかと、少なくとも70% (より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、または少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%) の配列同一性を共有するセグメントも含有することが可能である。同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって、決定可能である。あるいは、2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントは、Devereuxら (Nucl. Acids Res. 12: 387, 1984) により記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ (UWCG) より入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0を用いて、配列情報を比較することによって、決定可能である。GAPプログラムの好ましいデフォルトパラメーターには: (1) ヌクレオチドに関する単一 (unary) 比較マトリックス (同一に対し1および非同一に対し0の値を含む)、およびSchwartzおよびDayhoff監修, Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353 - 358, 1979に記載されるような、GribskovおよびBurgess, Nucl. Acids Res. 14: 6745, 1986の加重比較マトリックス; (2) 各ギャップに対する3.0のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに0.10のペナルティ; および (3) 末端ギャップに対するペナルティなし、が含まれる。配列比較の当業者に使用される他のプログラム、例えばNational Library of Medicineウェブサイトを紹介しての使用に利用可能なBLASTNプログラム、バージョン2.0.9、またはblast-wustlウェブサイトに記載される標準的デフォルトパラメーター設定を用いる、UW-BLAST 2.0アルゴリズムなどもまた、使用可能である。さらに、該BLASTアルゴリズムは、BLOSUM62アミノ酸スコア化マトリックスを用い、そして使用可能な所望によるパラメーターは、以下のとおりである: (A) 組成上の複雑さが低いクエリー配列のセグメント (Wootton & Federhen (Computers and Chemistry, 1993) のSEGプログラムによって決定されるようなもの; また、Wootton JCおよびFederhen S, 1996, Analysis of compositionally biased region in sequence database, Me

10

20

30

40

50

thods Enzymol. 266:554-71も参照されたい)、または短い周期の内部反復からなるセグメント(Claverie & States (Computers and Chemistry, 1993)のXNUプログラムによって決定されるようなもの)をマスクするフィルターの包含、および(B)データベース配列に対するマッチを報告する、統計的有意性の閾値、またはEスコア(KarlinおよびAltschul (1990)の確率論モデルによれば、単なる偶然によって見出されるマッチの期待される確率; マッチに割り当てられた統計的有意性がこのEスコア閾値より高ければ、該マッチは報告されないであろう); 好ましいEスコア閾値は0.5であり、または優先性を増加させるため、0.25、0.1、0.05、0.01、0.001、0.0001、 $1e-5$ 、 $1e-10$ 、 $1e-15$ 、 $1e-20$ 、 $1e-25$ 、 $1e-30$ 、 $1e-40$ 、 $1e-50$ 、 $1e-75$ 、または $1e-100$ である。

10

【0072】

本発明はまた、これらのポリペプチドの特定の断片またはドメインを含んでなる、サイピン・ポリペプチドの可溶性型もまた提供する。可溶性ポリペプチドは、発現される細胞から分泌されることが可能なサイピン・ポリペプチドである。可溶性サイピン・ポリペプチドにはまた、可溶性サイピン・ポリペプチドが細胞から分泌可能であり、そして好ましくは、サイピン・ポリペプチド活性を保持する限り、配列番号2のアミノ酸28~42に見られる疎水性シグナル配列を含むポリペプチドも含まれる。あるいは、組換え遺伝子発現技術を用いて、分泌を指示可能なシグナル配列をサイピンに融合させることが可能である。分泌された可溶性サイピン・ポリペプチドは、培地から、例えば遠心分離によって、所望のポリペプチドを発現する、損なわれていない細胞を分離し、そして所望のポリペプチドの存在に関して培地(上清)をアッセイすることによって、同定可能である。培地中の所望のポリペプチドの存在は、ポリペプチドが細胞から分泌され、そしてしたがって、該ポリペプチドの可溶性型であることを示す。可溶性型サイピン・ポリペプチドの使用は、多くの適用に好適である。可溶性ポリペプチドは細胞から分泌されるため、組換え宿主細胞からのポリペプチドの精製が容易になる。さらに、可溶性ポリペプチドは、一般的に、非経口投与に関して、そして多くの酵素的な方法に関して、細胞内型より適している。

20

【0073】

既知の技術を用いて、ペプチドまたはDNA配列中のさらなる修飾を行うことが可能である。ポリペプチド配列中の目的の修飾には、選択したアミノ酸残基の改変、置換、交換、挿入、または欠失が含まれる可能性がある。例えば、1以上のシステイン残基を欠失させるかまたは別のアミノ酸と交換して、分子のコンホメーションを改変することが可能であり、この改変は、フォールディングまたは再生に際して、正しくない分子内ジスルフィド架橋の形成を防ぐことを伴いうる。こうした改変、置換、交換、挿入または欠失のための技術は、当業者に公知である(例えば米国特許第4,518,584号を参照されたい)。別の例として、ポリペプチドのN-グリコシル化部位を修飾して、グリコシル化を妨げてよく、これにより哺乳動物および酵母発現系における炭水化物減少類似体(analog)の発現が可能になる。真核ポリペプチドのN-グリコシル化部位はアミノ酸トリプレットAsn-X-Yにより特徴付けられ、ここでXはPro以外のいかなるアミノ酸でもよく、そしてYはSerまたはThrである。これらのトリプレットをコードするヌクレオチド配列に対する適切な置換、付加または欠失の結果、Asn側鎖での炭水化物残基の結合が防止されるであろう。例えば、Asnが異なるアミノ酸によって交換されるように選択される、単一のヌクレオチドの改変は、N-グリコシル化部位を不活性化するのに十分である。あるいは、SerまたはThrを別のアミノ酸、例えばAlaで交換してもよい。ポリペプチドのN-グリコシル化部位を不活性化するための既知の方法には、米国特許第5,071,972号およびEP 276,846に記載されるものが含まれる。本発明の範囲内のさらなる変異体には、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基等の他の化学部分と共有または凝集コンジュゲートを形成することによって、修飾され、誘導体を生成する可能性があるポリペプチドが含まれる。共有誘導体は、アミノ酸側鎖上の官能基に、あるいはポリペプチドのN末端またはC末端の官能基に、化学部分を連結すること

30

40

50

によって、調製可能である。付着している診断用（検出可能）剤または療法剤を含んでなるコンジュゲートが本明細書に意図される。好ましくは、こうした改変、置換、交換、挿入または欠失は、ポリペプチドまたはその実質的な同等物の所望の活性を保持する。1つの例は、天然型と本質的に同一の結合親和性で結合する変異体である。結合親和性は、例えば米国特許第5,512,457号に記載されるように、そして本明細書に示すように、慣用法によって測定可能である。

【0074】

サイピンの有用な誘導体には、組換え的に発現したサイピンの精製および同定を容易にするため付加するペプチドを含んでなる融合ポリペプチドが含まれる。こうしたペプチドタグには、例えば、ポリ-Hisまたは米国特許第5,011,912号およびHoppら, Bio/Technology 6:1204, 1988に記載される抗原性同定ペプチドが含まれる。こうしたペプチドの1つはFLAG（登録商標）ペプチドであり、該ペプチドは抗原性が高く、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現した組換えポリペプチドの迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11と称されるネズミハイブリドーマは、米国特許第5,011,912号に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下でFLAG（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号第HB9259号でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されている。FLAG（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division、コネティカット州ニューヘブンより入手可能である。

【0075】

サイピン・ポリペプチドをコードする核酸

本発明内に含まれるのは、サイピン・ポリペプチドをコードする核酸である。これらの核酸は、適切な供給源からゲノムまたはcDNA分子を単離することを含む、いくつかの方法で同定可能である。核酸単離のためのプローブまたはプライマーとして、あるいはデータベース検索のためのクエリー配列として使用しようとする、本明細書に記載するアミノ酸配列に対応するヌクレオチド配列は、アミノ酸配列から「逆翻訳（back-translation）」することによって、またはコードDNA配列が同定されているポリペプチドとアミノ酸同一性を持つ領域を同定することによって、得ることが可能である。公知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を使用して、サイピン・ポリペプチドまたはサイピン・ポリペプチド断片の所望の組み合わせをコードするDNA配列を単離し、そして増幅することが可能である。DNA断片の組み合わせの所望の末端を定義するオリゴヌクレオチドを、5'および3'プライマーとして使用する。オリゴヌクレオチドは、発現ベクターに、増幅されたDNA断片の組み合わせを挿入するのを容易にするため、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を、さらに含有してもよい。PCR技術は、Saikiら, Science 239:487(1988); Recombinant DNA Methodology, Wuら監修, Academic Press, Inc., サンディエゴ(1989), pp.189-196; およびPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innisら監修, Academic Press, Inc. (1990)に記載される。

【0076】

本発明の核酸分子には、一本鎖および二本鎖型両方のDNAおよびRNAと共に対応する相補配列が含まれる。DNAには、例えば、cDNA、ゲノムDNA、化学的に合成したDNA、PCRによって増幅したDNA、およびその組み合わせが含まれる。本発明の核酸分子には、全長遺伝子またはcDNA分子と共に、その断片の組み合わせが含まれる。本発明の核酸は、優先的にヒト供給源由来であるが、本発明は非ヒト種由来のものもまた含む。

【0077】

10

20

30

40

50

「単離核酸分子」は、天然存在供給源から単離されている核酸の場合、核酸が単離された生物のゲノムに存在する隣接遺伝子配列から分離されているものである。例えば、PCR産物、cDNA分子、またはオリゴヌクレオチドなど、テンプレートから酵素的に、または化学的に合成された核酸の場合、こうしたプロセスから生じる核酸は、単離核酸と理解される。単離核酸分子は、別個の断片の形の、またはより大きい核酸構築物の構成要素としての、核酸分子を指す。1つの好ましい態様において、単離核酸は、実質的に、混入内因性成分を含まない。核酸分子は、好ましくは、少なくとも1度は、実質的に純粋な形で、そして標準的生化法(Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1989)に概略されるものなど)によって、その構成要素ヌクレオチド配列の同定、操作および回収を可能にする量または濃度で単離されているDNAまたはRNAに由来している。こうした配列は、好ましくは、真核遺伝子に典型的には存在する、内部非翻訳配列、またはイントロンに中断されない、オープンリーディングフレームの形で提供され、そして/または構築される。非翻訳DNAの配列は、オープンリーディングフレームの5'または3'に存在することが可能であり、ここでは該DNAは、コード領域の操作または発現に干渉しない。

10

【0078】

本発明にはまた、中程度にストリンジェントな条件下、そしてより好ましくは非常にストリンジェントな条件下で、本明細書に記載するサイピン・ポリペプチドをコードする核酸分子の相補体にハイブリダイズする、核酸も含まれる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrook, J., E.F. Fritsch, およびT. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 第9章および第11章; およびCurrent Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubelら監修, John Wiley & Sons, Inc, セクション2.10および6.3-6.4)によって示されており、そして例えばDNAの長さおよび/または塩基組成に基づいて、一般の当業者によって容易に決定可能である。中程度にストリンジェントな条件を達成する1つの方法は、5x SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0)を含有する前洗浄溶液、約6x SSCのハイブリダイゼーション緩衝液、および約68°Cのハイブリダイゼーション温度(または約42°Cのハイブリダイゼーション温度を伴う、約50%ホルムアミドを含有するものなどの他の同様のハイブリダイゼーション溶液)、並びに約60°C、0.5x SSC、0.1% SDS中の洗浄条件の使用を伴う。「SSC」(1x)は、0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0である。一般的に、高ストリンジェントな条件は、上記のようなハイブリダイゼーション条件と定義されるが、およそ68°C、0.2x SSC、0.1% SDSでの洗浄を伴うと定義される。望ましい場合、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液において、SSPE (1x SSPEは、0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄、および1.25mM EDTA, pH 7.4である)をSSCの代わりに使用することが可能であり、そしてストリンジェンシーに影響を与えることなく、SDSを上述の緩衝液のいずれから省くことも可能である。洗浄はハイブリダイゼーション完了後、15分間行う。当業者に知られるように、そして以下にさらに記載するように、ハイブリダイゼーション反応および二重鎖安定性を支配する基本原理を適用することによって、必要に応じて、所望の度合いのストリンジェンシーを達成するよう、洗浄温度および洗浄塩濃度を調整可能である(例えばSambrookら、1989を参照されたい)。長さ50塩基対未満であると予測されるハイブリッド二重鎖のハイブリダイゼーション温度は、最適には、二重鎖の融解温度(T_m)より5~10°C低く、T_mは、以下の等式にしたがって決定する。長さ18塩基対未満のハイブリッドに

20

30

40

50

関しては、 $T_m() = 2(A + T \text{塩基数}) + 4(G + C \text{塩基数})$ である。長さ18塩基対を超えるハイブリッドに関しては、 $T_m() = 81.5 + 16.6(\log_{10}[Na^+]) + 0.41(\%G + C) - (600 / N)$ であり、式中、Nはハイブリッド中の塩基数であり、そして $[Na^+]$ はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオン濃度である($1 \times SSC$ の $[Na^+] = 0.165M$)。好ましくは、こうしたハイブリダイズする核酸分子は各々、少なくとも15ヌクレオチド(またはより好ましくは少なくとも18ヌクレオチド、または少なくとも20ヌクレオチド、または少なくとも25ヌクレオチド、または少なくとも30ヌクレオチド、または少なくとも40ヌクレオチド、または最も好ましくは少なくとも50ヌクレオチド)の長さを有するか、またはハイブリダイズする本発明の核酸の長さの少なくとも25%(より好ましくは少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、そして最も好ましくは少なくとも80%)の長さを有し、そして配列同一性が、配列ギャップを最小にしつつ、重複および同一性が最大になるように並列させた際のハイブリダイズする核酸配列の比較によって決定される場合、ハイブリダイズする本発明の核酸と、少なくとも60%(より好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97.5%、または少なくとも99%、そして最も好ましくは少なくとも99.5%)の配列同一性を有する。

10

【0079】

本発明はまた、本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子も提供する。「対応する遺伝子」または「対応するゲノム核酸」は、転写されて、cDNA核酸配列が由来するmRNAを産生する、ゲノム領域であり、そしてこうした遺伝子の制御された発現に必要なゲノムの隣接領域を含むことが可能である。したがって、対応する遺伝子には、限定されるわけではないが、コード配列、5'および3'非翻訳領域、選択的スプライシングされるエクソン、イントロン、プロモーター、エンハンサー、およびサイレンサーまたはサプレッサー要素が含まれる可能性がある。対応する遺伝子は、例えば、プローブまたはPCRプライマーを設計するため本明細書に開示する配列情報を用いて、既知の方法にしたがい、単離することが可能である。こうした方法には、適切なゲノムライブラリーまたはゲノム材料の他の供給源における、遺伝子の同定および/または増幅のため、開示される配列情報からのプローブまたはプライマーの調製が含まれる。「単離遺伝子」または「単離ゲノム核酸」は、ゲノム核酸を単離する生物のゲノムに存在する、隣接するゲノム配列から分離されているゲノム核酸である。

20

30

【0080】

サイピン・ポリペプチドを作成し、そして精製する方法

本発明のポリペプチドおよび断片の発現、単離および精製のための方法は、いかなる適切な技術によって達成してもよく、限定されるわけではないが以下の方法を含む。組換えサイピン・ポリペプチドを産生するのに好ましい宿主細胞は、COS-7、CV-1、293およびCHO細胞である。これらのサイピン・ポリペプチドのグリコシル化プロフィールはその活性に重要である。サイピン・ポリペプチドを作成するための、他の好ましいポリペプチドプロセッシング法は、特定のプロセッシング、結合、またはシャペロンポリペプチドの使用を伴う。

40

【0081】

ポリペプチドを組換え的に産生するため、Kaufmanら, Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490(1991); および Pouwelsら, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, ニューヨーク, (1985)に開示される、pDC412またはpDC314ベクター、あるいはpMT2またはpED発現ベクターなどの発現調節配列に、本発明の単離核酸を機能可能であるように連結することが可能である。多くの適切な発現調節配列が当該技術分野に知られる。R. Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566(1990)に記載されるものなど、組換えポリペプチドを発現させる一般的な方法もまた知られる。本明細書において、「機

50

能可能であるように連結した」は、本発明の核酸および発現調節配列が、構築物、ベクター、または細胞内で、適切な分子（例えばポリメラーゼ）が存在する場合、核酸にコードされるポリペプチドが発現されるような方式で、位置していることを意味する。本発明の1つの態様として、少なくとも1つの発現調節配列が、組換え宿主細胞またはその子孫において、本発明の核酸に、機能可能であるように連結しており、核酸および/または発現調節配列が、例えば形質転換またはトランスフェクションによって、あるいは他の適切な方法いずれかによって、宿主細胞に導入されている。本発明の別の態様として、少なくとも1つの発現調節配列が、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列に、機能可能であるように連結しているように、組換え宿主細胞のゲノムに組み込まれる。本発明のさらなる態様において、少なくとも1つの発現調節配列が、*in vitro*または組換え宿主細胞いずれかにおいて、転写因子などのトランス作用因子の作用を通じて、本発明の核酸に機能可能であるように連結される。

10

【0082】

さらに、分泌を促進するシグナルペプチド（天然または異種）をコードする配列を、発現ベクターに取り込んでもよい。シグナルペプチドまたはリーダーの選択は、組換えポリペプチドを産生しようとする宿主細胞の種類などの要因に応じる可能性がある。例えば、哺乳動物宿主細胞で機能する、異種シグナルペプチドの例には、米国特許第4,965,195号に記載されるインターロイキン-7（IL-7）のシグナル配列；Cosmanら、*Nature* 312:768（1984）に記載されるインターロイキン-2受容体のシグナル配列；EP 367,566に記載されるインターロイキン-4受容体シグナルペプチド；米国特許第4,968,607号に記載されるI型インターロイキン-1受容体シグナルペプチド；およびEP 460,846に記載されるII型インターロイキン-1受容体シグナルペプチドが含まれる。シグナルペプチド（分泌リーダー）のDNA配列を、インフレームで本発明の核酸配列に融合させ、DNAがまず転写され、そしてmRNAがシグナルペプチドを含んでなる融合ポリペプチドに翻訳されるようにしてもよい。意図される宿主細胞で機能するシグナルペプチドは、その宿主細胞において、ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。シグナルペプチドは、細胞からのポリペプチドの分泌に際し、ポリペプチドから切断される。当業者はまた、シグナルペプチドが切断される、単数または複数の位は、コンピュータープログラムに予測されるものと異なる可能性があり、そして組換えポリペプチドを発現するのに使用する宿主細胞の種類などの要因にしたがって、多様である可能性があることも認識するであろう。ポリペプチド調製は、1より多い部位でのシグナルペプチドの切断から生じる、異なるN末端アミノ酸を有するポリペプチド分子の混合物を含む可能性がある。

20

30

【0083】

哺乳動物細胞内にDNAを導入するための確立された方法が、記載されている（Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69）。Lipofectamine脂質試薬（Gibco/BRL）またはLipofectamine-Plus脂質試薬などの商業的に入手可能な試薬を用いた、さらなるプロトコルを用いて、細胞をトランスフェクションすることが可能である（Felgnerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1987）。さらに、エレクトロポレーションを用い、Sambrookら（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版 Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）におけるもののような慣用法を用いて、哺乳動物細胞をトランスフェクションすることが可能である。安定形質転換体の選択は、例えば細胞傷害性薬剤に対する耐性など、当該技術分野に知られる方法を用いて、行うことが可能である。Kaufmanら、*Meth. in Enzymology* 185:487-511, 1990は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）耐性などのいくつかの選択計画を記載する。DHFR選択に適した株は、DHFR不全であるCHO株DX-B11である（UrlaubおよびChasin, P

40

50

roc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980)。DHFR cDNAを発現しているプラスミドを株DX-B11に導入することが可能であり、そしてプラスミドを含有する細胞のみを適切な選択培地中で増殖させることが可能である。発現ベクターに組み込み可能な選択可能マーカーの他の例には、G418およびハイグロマイシンBなどの抗生物質に対する耐性を与えるcDNAが含まれる。該ベクターを宿する細胞を、これらの化合物に対する耐性に基づいて選択可能である。

【0084】

あるいは、サイピン遺伝子産物は、相同組換え、または「遺伝子ターゲティング」技術を介して、得ることが可能である。こうした技術は、ゲノム上の特にあらかじめ決定した部位において、外因性転写調節要素(CMVプロモーター等)の導入を使用して、目的の内因性核酸配列の発現を誘導する(例えば米国特許第5,272,071号を参照されたい)。宿主染色体またはゲノムへの組み込み位置は、遺伝子の既知の位置および配列を考慮すれば、当業者の1人によって容易に決定可能である。好ましい態様において、本発明は、増幅可能遺伝子と組み合わせた外因性転写調節要素を導入して、やはり宿主細胞から遺伝子配列自体を単離する必要なしに、増加した量の遺伝子産物を産生することもまた意図する。

【0085】

いくつかの細胞種が、ポリペプチドの発現に適した宿主細胞として作用することが可能である。哺乳動物宿主細胞には、例えば、サル腎臓細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzmanら, Cell 23:175, 1981)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞株、McMahonら(EMBO J. 10:2821, 1991)に記載されるような、アフリカミドリザル(African green monkey)腎臓細胞株CV1(ATCC CCL 70)由来であるCV1/EBNA細胞株、ヒト腎臓293細胞、ヒト上皮A431細胞、ヒトColo205細胞、他の形質転換霊長類細胞株、正常二倍体細胞、初代組織のin vitro培養由来の細胞株、初代外植片、HL-60、U937、HaKまたはJurkat細胞が含まれる。あるいは、酵母などのより低次の真核生物において、または細菌などの原核生物において、ポリペプチドが産生可能である。適切な酵母株には、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クロイペロミセス属(Kluyveromyces)株、カンジダ属(Candida)種、ピキア属(Pichia)種または異種ポリペプチドを発現可能ないかなる酵母株も含まれる。潜在的に適切な細菌株には、大腸菌(Escherichia coli)、枯草菌(Bacillus subtilis)、ネズミチフス菌(Salmonella typhimurium)、または異種ポリペプチドを発現可能ないかなる細菌株も含まれる。ポリペプチドを酵母または細菌で作成する場合、機能するサイピン・ポリペプチドを得るため、そこで産生されるポリペプチドを、例えば適切な部位でのリン酸化またはグリコシル化によって、修飾することが必要である可能性がある。こうした共有結合は、既知の化学的または酵素的方法を用いて、達成可能である。ポリペプチドはまた、本発明の単離核酸を、1以上の昆虫発現ベクターの適切な調節配列に、機能可能であるように連結し、そして昆虫発現系を使用することによって、産生することも可能である。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系の材料および方法は、例えばInvitrogen、米国カリフォルニア州サンディエゴからキットの形で(MaxBac(登録商標)キット)商業的に入手可能であるし、そしてこうした方法は、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)、並びにLuckowおよびSummers, Bio/Technology 6:47(1988)に記載されるように公知である。本明細書において、本発明の外来性核酸を発現するように修飾された昆虫細胞は「形質転換」されたとみなされる。細胞不含翻訳系もまた、本明細書に開示する核酸構

10

20

30

40

50

築物由来のRNAを用いて、ポリペプチドを産生するのに使用可能である。好ましくは、少なくとも1つの発現調節配列に機能可能であるように連結している、本発明の単離核酸を含んでなる宿主細胞は、「組換え宿主細胞」である。

【0086】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド発現を支持するのに適した培養条件下で、形質転換宿主細胞を培養することによって、調製可能である。生じた発現ポリペプチドをその後、多様な塩での選択的沈殿、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーなどの、既知の精製法を用いて、こうした培養（すなわち培地または細胞抽出物）から精製することが可能である。ポリペプチドの精製はまた、ポリペプチドに結合するであろう剤を含むアフィニティークラム；コンカナバリンA - アガロース、ヘパリン - toyopearl（登録商標）またはCibacromブルー3GAセファロース（登録商標）のようなアフィニティ樹脂上の1又はそれより多くのカラム工程；フェニルエーテル、ブチルエーテル、またはプロピルエーテルのような樹脂を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーを伴う1又はそれより多くの工程；あるいは1以上のサイピン・エピトープに特異的に結合する抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーも含むことが可能である。

10

【0087】

あるいは、本発明のポリペプチドは、精製を容易にするであろう型で発現することも可能である。例えば、融合ポリペプチドとして発現することが可能であり、すなわち、マルトース結合ポリペプチド（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン（TRX）またはポリHISと融合させることが可能である。こうした融合ポリペプチドの発現および精製のためのキットは、それぞれ、New England Biolab（マサチューセッツ州ピバリー）、Pharmacia（ニュージャージー州ピスカタウェイ）およびInvitrogenから、商業的に入手可能である。ポリペプチドはまた、非サイピン・エピトープでタグ付けして、そして続いて、こうしたエピトープに対して向けられる特異的抗体を用いることによって、精製することも可能である。1つのこうしたエピトープ（「Flag（登録商標）」）は、Kodak（コネティカット州ニューヘブレン）から商業的に入手可能である。最後に、疎水性逆相高性能液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）媒体、例えばペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する、1又はそれより多くのRP-HPLC工程を使用して、ポリペプチドをさらに精製することが可能である。多様な組み合わせの前述の精製工程のいくつかまたはすべてを使用して、実質的に均一な単離組換えポリペプチドを提供することもまた可能である。こうして精製したポリペプチドは、他の哺乳動物ポリペプチドを実質的に含まず、そして本発明にしたがって、「単離ポリペプチド」と定義される。上述の精製法を用いて、サイピンおよびサイピン断片と共に、サイピン・ポリペプチドに結合する抗体、断片、変異体、結合パートナー等を単離可能である。本発明のポリペプチドはまた、ヒト・サイピン・ポリペプチドをコードする核酸が挿入されている体細胞または生殖細胞を含有することによって特徴付けられる、トランスジェニック動物の産物として、例えば、トランスジェニックウシ、ヤギ、ブタ、またはヒツジのミルクの構成要素として、発現することも可能である。

20

30

40

【0088】

サイピンに対して、またはその抗原性断片に対して生成したモノクローナル抗体などの、サイピン・ポリペプチドに結合可能なポリペプチドを含んでなるアフィニティークラムを利用して、発現したサイピン・ポリペプチドをアフィニティ精製することもまた、可能である。これらのサイピン・ポリペプチドは、慣用的な技術を用いて、例えば利用するアフィニティマトリックスに応じて、高塩溶出緩衝液中で、そしてその後、使用のため、より低塩の緩衝液中に透析することによって、またはpHもしくは他の構成要素を変化させることによって、アフィニティークラムからはずす（remove）ことが可能であるし、あるいは本発明から得られるポリペプチドなどの、アフィニティ部分の天然存在基質を用いて、競合的にはずすことが可能である。本発明のこの側面において、本発明の抗

50

サイピン抗体、またはサイピンもしくはその断片と相互作用可能な他のポリペプチドなどの、サイピン結合ポリペプチドは、その表面上に本発明のポリペプチドを発現する細胞を同定するか、分離するかまたは精製するのに適した、カラムクロマトグラフィーマトリックスなどの固相支持体または類似の支持体に結合させることが可能である。固相接触表面への本発明のサイピン結合ポリペプチドの付着は、いかなる手段によって達成してもよく、例えば、磁気微小球体を、これらのポリペプチド結合ポリペプチドでコーティングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器中に保持してもよい。細胞混合物の懸濁物を、こうしたポリペプチド結合ポリペプチドを有する固相と接触させる。表面上に本発明のポリペプチドを有する細胞は、固定サイピン結合ポリペプチドに結合し、そして未結合細胞は洗い流される。このアフィニティー結合法は、溶液から、こうしたサイピン発現細胞を精製するか、スクリーニングするか、または分離するのに有用である。陽性に選択された細胞を固相から遊離させる方法は、当該技術分野に知られ、そして例えば、酵素の使用を含む。こうした酵素は、好ましくは細胞に対し非毒性および非傷害性であり、そして好ましくは細胞表面結合パートナーを切断するよう指示される。あるいは、本発明のポリペプチド発現細胞を含有すると推測される細胞混合物を、まず、ビオチン化した本発明のサイピン結合ポリペプチドとインキュベーションすることが可能である。その後、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに、生じた混合物を通過させ、それによりアビジンに対するビオチンの高い親和性によって、ポリペプチドが結合した細胞がビーズに結合する。アビジンでコーティングしたビーズの使用は当該技術分野に知られる。Berensonら, J. Cell. Biochem., 10D: 239 (1986) を参照されたい。未結合成分の洗浄および結合細胞の遊離は慣用法を用いて行う。

10

20

【0089】

ポリペプチドはまた、既知の慣用的な化学合成によっても産生可能である。合成によって構築されたポリペプチド配列は、ポリペプチドと一次、二次または三次構造および/またはコンホメーション特性を共有するため、ポリペプチド活性を含め、それと共通の生物学的特性を所持する可能性がある。したがって、これらは、療法化合物のスクリーニングにおいて、そして抗体発展のための免疫学的方法において、天然の精製ポリペプチドの生物学的に活性であるまたは免疫学的な置換体として、使用可能である。

【0090】

所望の純度は、ポリペプチドの意図される使用に応じる。例えば、ポリペプチドを *in vivo* で投与しようとするとき、比較的高い純度が望ましい。こうした場合、ポリペプチドは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による解析に際し、他のポリペプチドに相当するポリペプチドバンドが検出不能であるように精製される。当業者は、異なるグリコシル化、異なる翻訳後プロセッシング等のため、該ポリペプチドに相当する多数のバンドが SDS-PAGE により視覚化される可能性があることを認識するであろう。最も好ましくは、本発明のポリペプチドは、SDS-PAGE による解析の際、単一のポリペプチドバンドにより示されるように、実質的に均一に精製される。ポリペプチドバンドは、銀染色、クーマシーブルー染色によって、または (ポリペプチドが放射標識されている場合) オートラジオグラフィーによって、視覚化可能である。

30

【0091】

サイピン・ポリペプチドのアンタゴニストおよびアゴニスト

サイピン・ポリペプチドを中和するか、またはサイピン遺伝子の発現 (転写または翻訳いずれか) を阻害するいかなる方法を用いて、サイピン・ポリペプチドの生物学的活性を減少することも可能である。特定の態様において、アンタゴニストは、細胞への少なくとも1つのサイピン・ポリペプチドの結合を阻害し、それによって、細胞へのこうしたサイピン・ポリペプチドの結合によって誘導される生物学的活性を阻害する。他の態様において、アンタゴニストは標的プロテアーゼへの少なくとも1つのサイピン・ポリペプチドの結合を阻害する。さらに他の態様において、アンタゴニストを設計して、内因性サイピン遺伝子発現のレベルを減少させることが可能であり、例えばサイピン mRNA 転写物の翻訳を阻害するかまたは妨げる、公知のアンチセンスまたはリボザイムアプローチ; サイピン

40

50

遺伝子の転写を阻害する三重らせんアプローチ；あるいは、サイピン遺伝子またはその内因性プロモーターもしくはエンハンサー要素を不活性化するかまたは「ロックアウト」する、標的化相同組換えを用いる。こうしたアンチセンス、リボザイム、および三重らせんアンタゴニストを設計して、損なわれていないサイピン遺伝子活性、または適切な場合、突然変異体サイピン遺伝子活性いずれかを減少させるかまたは阻害することが可能である。こうした分子を産生し、そして使用する技術は、当業者に公知である。

【0092】

アンチセンスRNAおよびDNA分子は、標的とする内因性mRNAにハイブリダイズし、それによって翻訳を妨げることによって、mRNAの翻訳を直接遮断するよう作用することが可能である。このアンチセンスアプローチは、サイピンmRNAに相補的なオリゴヌクレオチド（DNAまたはRNAいずれか）の設計を伴う。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的標的遺伝子mRNA転写物に結合し、そして翻訳を妨げるであろう。絶対の相補性は、好ましいが、必要ではない。本明細書に称されるような、サイピン核酸に「相補的な」アンチセンス分子は、標的核酸とハイブリダイズし、安定な二重鎖（または適切な場合、三重鎖）を形成することが可能であるのに十分な相補性を有する配列を意味する。したがって、二本鎖アンチセンス核酸の場合、二重鎖DNAの一本鎖を試験してもよいし、または三重鎖形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイズする能力は、アンチセンス核酸の相補性の度合いおよび長さ両方に応じるであろう。好ましいオリゴヌクレオチドは、メッセージの5'端、例えば、AUG開始コドンまでおよび該開始コドンを含む、5'非翻訳配列に相補的なものである。しかし、サイピン遺伝子転写物の5'または3'非翻訳、非コード領域、あるいはコード領域に相補的なオリゴヌクレオチドが使用可能である。

10

20

【0093】

mRNAの5'非翻訳領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドには、好ましくは、AUG開始コドンの相補体が含まれる。アンチセンス核酸は、少なくとも長さ6ヌクレオチドでなければならず、そして好ましくは、長さ6～約50ヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドである。特定の側面において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも50ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAまたはキメラ混合物またはその誘導体または修飾型であってもよい。本発明のキメラオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、または混合オリゴヌクレオチド/オリゴヌクレオシドは、いくつかの異なる種類であることが可能である。これらには、ヌクレオチドの「ギャップ」セグメントが連結ヌクレオシドの5'および3'「ウィング」セグメントの間に位置する第一の種類、並びに「ギャップ」セグメントがオリゴマー化合物の3'または5'末端いずれかに位置する第二の「オープン端」型が含まれる（例えば米国特許第5,985,664号を参照されたい）。第一の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ギャップマー」またはギャップ化オリゴヌクレオチドとしても知られる。第二の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ヘミマー」または「ウィングマー」としても知られる。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸主鎖で修飾して、例えば分子の安定性、ハイブリダイゼーション等を改善することが可能である。オリゴヌクレオチドは、ペプチド（例えば宿主細胞受容体をin vivoで標的とするため）、または細胞膜を横切る輸送を促進する剤（例えばLettingerら, 1989, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 86:6553-6556; Lemaîtreら, 1987, Proc Natl Acad Sci 84:648-652; PCT公報第WO88/09810号を参照されたい）、あるいはハイブリダイゼーション誘発切断剤または挿入剤（intercalating agent）（例えばZon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549を参照されたい）などの他の付随する基を含んでもよい。アンチセンス分子は、サイピン転写物をin vivoで発現する細胞に搬送しなければならない。

30

40

【0094】

50

アンチセンスDNAまたはRNAを細胞に搬送するために、いくつかの方法が開発されてきている；例えば、アンチセンス分子は、組織または細胞由来部位に直接注入してもよいし、または所望の細胞を標的とするよう設計された、修飾アンチセンス分子（例えば標的細胞表面上に発現される受容体または抗原に特異的に結合するペプチドまたは抗体に連結したアンチセンス）を、全身投与してもよい。しかし、内因性mRNAの翻訳を抑制するのに十分なアンチセンス細胞内濃度を達成するのは、しばしば困難である。したがって、好ましいアプローチは、アンチセンスオリゴヌクレオチドが強いpol IIIまたはpol IIIプロモーターの調節下に置かれる組換えDNA構築物を利用する。患者において、標的細胞をトランスフェクションするための、こうした構築物の使用は、内因性サイピン遺伝子転写物と相補的塩基対を形成するであろう一本鎖RNAの十分な量の転写を生じ、そしてそれによって、サイピンmRNAの翻訳を妨げるであろう。例えば、ベクターが細胞に取り込まれ、そしてアンチセンスRNAの転写を指示するように、ベクターをin vivoで導入することが可能である。こうしたベクターは、転写され、所望のアンチセンスRNAを産生することが可能でありさえすれば、エピソームにとどまっても、または染色体に組み込まれてもよい。こうしたベクターは、当該技術分野で標準的な組換えDNA技術法によって、構築することが可能である。ベクターは、哺乳動物細胞における複製および発現で用いられる、プラスミドベクター、ウイルスベクター、または当該技術分野に知られる他のベクターであってもよい。

10

【0095】

サイピンmRNA転写物を触媒的に切断するよう設計されたリボザイム分子もまた、サイピンmRNAの翻訳およびサイピン・ポリペプチドの発現を防止するのに使用可能である（例えば、PCT国際公報WO90/11364、1990年10月4日公開；米国特許第5,824,519号を参照されたい）。本発明で使用可能なリボザイムには、ハンマーヘッドリボザイム（HaseloffおよびGerlach, 1988, Nature, 334:585-591）、テトラヒメナ・サーモフィラ（Tetrahymena Thermophila）に天然に存在し（IVS、またはL-19 IVS RNAとして知られる）、そして詳細に記載されている（例えばWO 88/04300；BeenおよびCech, Cell, 47:207-216（1986）を参照されたい）ものなどのRNAエンドリボヌクレアーゼ（以後、「Cech型リボザイム」）が含まれる。アンチセンスアプローチにおけるように、リボザイムは、修飾オリゴヌクレオチドで構成されていてもよく（例えば改善された安定性、標的化などのため）、そしてin vivoでサイピン・ポリペプチドを発現する細胞に搬送しなければならない。搬送の好ましい方法は、トランスフェクションされた細胞が、十分な量のリボザイムを産生し、内因性サイピン・メッセージを破壊し、そして翻訳を阻害するであろうように、強い恒常的pol IIIまたはpol IIIプロモーターの調節下にあるリボザイムコードDNA構築物を用いることを伴う。リボザイムは、アンチセンス分子と異なり、触媒性であるため、有効であるために、より低い細胞内濃度しか必要とされない。

20

30

【0096】

あるいは、標的遺伝子の制御領域（すなわち標的遺伝子プロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を用いて、標的サイピン遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成することによって、内因性サイピン遺伝子発現を減少させることが可能である（一般的には、Helene, 1991, Anticancer Drug Des. 6(6), 569-584；Heleneら, 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci., 660, 27-36；およびMaher, 1992, Bioassays 14(12), 807-815を参照されたい）。

40

【0097】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、並びに三重らせん分子は、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成を含む、DNAおよびRNA分子合成のための、当該技術分野に知られるいかなる方法によって、調製することも可能である。オリゴヌクレオ

50

チドは、当該技術分野に知られる標準法によって、例えば自動化DNA合成装置(Biosearch、Applied Biosystemsなどから商業的に入手可能なものなど)の使用によって、合成することが可能である。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinら、1988、Nucleic Acids Res. 16:3209の方法によって、合成することが可能である。メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御孔ガラスポリマー支持体(Sarinら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451)の使用によって、調製することが可能である。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列の*in vitro*または*in vivo*転写によって、生成することが可能である。こうしたDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを取り込む、非常に多様なベクターに取り込むことが可能である。あるいは、用いるプロモーターに応じて、恒常的にまたは誘導性に、アンチセンスRNAを合成する、アンチセンスcDNA構築物を、細胞株に安定して導入することが可能である。

10

【0098】

内因性標的遺伝子発現はまた、標的化相同組換えを用いて、標的遺伝子またはそのプロモーターを不活性化するかまたは「ノックアウト」することによって、減少させることも可能である(例えばSmithiesら、1985、Nature 317, 230-234; ThomasおよびCapecci, 1987, Cell 51, 503-512; Thompsonら、1989, Cell 5, 313-321を参照されたい)。標的遺伝子を*in vivo*で発現する細胞をトランスフェクションするため、例えば、内因性標的遺伝子(標的遺伝子のコード領域または制御領域いずれか)に相同なDNAが隣接する、突然変異体非機能標的遺伝子(または完全に無関係なDNA配列)を、選択可能マーカーおよび/または陰性選択可能マーカーを伴い、または伴わず、用いることが可能である。標的化相同組換えを介した、DNA構築物の挿入は、標的遺伝子の不活性化を生じる。こうしたアプローチは、ES(胚性幹)細胞への修飾を用いて、不活性な標的遺伝子を持つ動物子孫を生成することが可能な場合の農業分野において(例えばThomasおよびCapecci、1987、並びにThompson、1989、上記を参照されたい)、または「RNA干渉」(「RNAi」)技術(Grishok A, Tabara H, およびMello CC, 2000, Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*, Science 287(5462):2494-2497)、または導入遺伝子の導入(Dernburg AF, Zalevsky J, Colaiacovo MP, およびVilleneuve AM, 2000, Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line, Genes Dev. 14(13):1578-1583)を用いて、特定の標的遺伝子の発現を阻害する、線虫(*Caenorhabditis elegans*)などのモデル生物において、特に適している。このアプローチは、組換えDNA構築物が、直接投与されるか、またはウイルスベクターなどの適切なベクターを用いて、*in vivo*で必要な部位を標的とするのであれば、ヒトで使用するために、適応させることが可能である。

20

30

40

【0099】

本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子(類)の、増進した、減少した、または修飾された発現を有する生物を提供する。遺伝子発現の所望の変化は、該遺伝子から転写されるmRNAに結合し、そして/または該mRNAを切断する、アンチセンス核酸またはリボザイムの使用を通じて達成することが可能である(AlbertおよびMorris, 1994, Trends Pharmacol. Sci. 15(7):250-254; Lavaroskyら、1997, Biochem. Mol. Med. 62(1):11-22; およびHampel, 1998, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 58:1-39)。好ましくは

50

、形質転換細胞およびその子孫内に安定して維持される遺伝子構築物で、細胞を形質転換することによって産生される、本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子（類）を多コピー有するトランスジェニック動物を提供する。遺伝子発現レベルを増加させるかまたは減少させる、あるいは遺伝子発現の時間的または空間的パターンを変化させる、修飾遺伝子調節領域を有する、トランスジェニック動物もまた、提供する（欧州特許第0 6 4 9 4 6 4 B 1を参照されたい）。さらに、本明細書に開示する核酸配列に対応する遺伝子（類）が、対応する遺伝子（類）への外来性配列の挿入を通じて、あるいは対応する遺伝子（類）のすべてまたは一部の欠失を通じて、部分的にまたは完全に不活性化されている、生物を提供する。部分的または完全遺伝子不活性化は、挿入、好ましくは、その後の転位因子の不正確な切除を通じて達成可能である（Plasterk, 1992, Bioessays 14(9): 629-633; Zwaalら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(16): 7431-7435; Clarkら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(2): 719-722）か、あるいは相同組換えを通じて達成し、好ましくは、陽性/陰性遺伝子選択戦略によって検出することが可能である（Mansourら, 1988, Nature 336: 348-352; 米国特許第5, 464, 764号; 第5, 487, 992号; 第5, 627, 059号; 第5, 631, 153号; 第5, 614, 396号; 第5, 616, 491号; および第5, 679, 523号）。改変された遺伝子発現を持つ、これらの生物は、好ましくは真核生物であり、そしてより好ましくは哺乳動物である。こうした生物は、対応する遺伝子（類）に關与する障害の研究のための非ヒトモデルの開発に、そして対応する遺伝子（類）のポリペプチド産物（類）と相互作用する分子の同定のためのアッセイ系の開発に、有用である。

10

20

30

40

50

【0100】

やはり提供されるのは、（1）サイピン変異体が、なおそのパートナー（類）に結合するが、特定の小分子が改変された結合部位に収まり、そしてその相互作用を遮断するであろうように、または（2）特定の小分子が存在しない限り、サイピン変異体がもはやそのパートナー（類）に結合しないであろうように、コンホメーションが改変されている、パートナー結合部位を持つ、サイピン・ポリペプチド変異体である（例えばBishopら, 2000, Nature 407: 395-401を参照されたい）。こうした改変サイピン・ポリペプチドをコードする核酸を、本明細書に記載する方法にしたがって、生物に導入して、そして対応するサイピン・ポリペプチドをコードする内因性核酸配列を交換することが可能である。こうした方法は、生物に、全身または局所方式で、小分子化合物を投与することによって、特定のサイピン・ポリペプチドとその結合パートナーとの相互作用が制御されるのを可能にする。

【0101】

サイピン・ポリペプチド自体はまた、*in vitro*または*in vivo*法で、サイピンの生物学的活性を阻害するのに使用可能である。本発明内に含まれるのは、断片として、または融合ポリペプチドの構成要素として発現した際、天然サイピン・ポリペプチド機能の「優性ネガティブ」阻害剤として作用する、サイピン・ポリペプチドである。例えば、サイピンRSLドメイン（配列番号2のアミノ酸374~395）を含んでなる精製ポリペプチドを用いて、内因性結合パートナーへの内因性サイピン・ポリペプチドの結合を阻害することが可能である。こうした使用は、効果的にサイピン・ポリペプチド相互作用を遮断し、そしてサイピン・ポリペプチド活性を阻害するであろう。

【0102】

好ましい態様において、配列番号2に示すサイピン・ポリペプチドと特異的に結合する抗体を用いて、サイピンがその標的プロテアーゼ（類）を阻害する能力をアンタゴナイズする。例えば、サイピン・ポリペプチドのエピトープ、またはサイピン・ポリペプチドの保存変異体のエピトープ、またはサイピン・ポリペプチドのペプチド断片の1以上を特異的に認識する抗体を、本発明において用いて、サイピン・ポリペプチド活性を阻害可能である。こうした抗体には、限定されるわけではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナ

ル抗体 (m A B)、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、F a b 断片、F (a b ') 2 断片、F a b 発現ライブラリーに産生される断片、抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体、および上記いずれかのエピトープ結合断片が含まれる。療法用量において、こうした抗体を投与して、サイピンの過剰発現または異常発現によって特徴付けられる疾患を治療することが可能である。サイピン特異的抗体がサイピン活性をアンタゴナイズする能力は、例えば、抗体の存在下および非存在下で、サイピンのプロテアーゼ阻害活性を測定するアッセイにおいて、決定可能である。

【 0 1 0 3 】

本発明の精製および修飾サイピン・ポリペプチドを投与して、サイピン・ポリペプチドおよび膜結合型でないサイピン結合パートナー間の相互作用を変調して、例えばサイピン、および細胞外マトリックス、血清またはサイピンが発現される細胞の細胞質中に存在する標的プロテアーゼの相互作用を変調することが可能である。こうした相互作用の変調は、サイピンが影響を及ぼす生物活性修飾の手段を提供することが可能である。

10

【 0 1 0 4 】

別の側面において、本発明は、サイピン・ポリペプチド活性の増加が有益である疾患の症状を治療するかまたは寛解するための、サイピン・ポリペプチド活性のアゴニストの使用をさらに含む。好ましい側面において、本発明は、サイピン核酸またはサイピン・ポリペプチドを含んでなる組成物を、i n v i t r o の細胞、e x v i v o の細胞、i n v i v o の細胞、および / または脊椎動物または哺乳動物などの多細胞生物に用いることを含む。サイピンの好ましい療法型は、上述のように可溶性型である。本発明のさらに別の側面において、本発明は、サイピン・ポリペプチド発現用のサイピン・コード核酸を含有する組成物の療法的に有効な量を、疾患治療のため宿主生物に投与すること、あるいは薬学的に許容しうるキャリアーと共に、精製組換えサイピンの療法的に有効な量を投与することを含んでなる方法を含む。こうした方法は、サイピン・ポリペプチド内因性活性の減少と関連する病理学的状態の治療に有用である。さらに、本発明は、サイピン・ポリペプチド内因性活性を増加させることが見出された化合物の細胞および / または生物への投与を含む。

20

【 0 1 0 5 】

サイピン・ポリペプチド活性を増加させる化合物の一例は、抗体がサイピンに結合すると、サイピン活性が増加する、アゴニスト抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。あるいは、こうした抗体は、例えばサイピンがサイピン・ポリペプチド活性の天然阻害剤に結合するのを防止することによって、サイピン・ポリペプチド活性を増加させることが可能である。サイピン特異的抗体がサイピン活性をアンタゴナイズするかまたはアゴナイズする能力は、抗体の存在下および非存在下で、サイピンのプロテアーゼ阻害活性を測定するアッセイにおいて、決定可能である。

30

【 0 1 0 6 】

サイピン・ポリペプチドに対する抗体

本発明のポリペプチドと特異的に免疫反応性である抗体を本明細書に提供する。こうした抗体は、抗体の抗原結合部位を介して (非特異的結合と対照的に)、サイピン・ポリペプチドに特異的に結合する。本発明において、特異的に結合する抗体は、サイピン・ポリペプチドまたはその下位部分、相同体、および変異体またはサイピン融合タンパク質を特異的に認識して、そしてこれらの分子と結合するが、他の分子とは結合しないであろうものである。1つの好ましい態様において、抗体は、アミノ酸配列が配列番号2に示すものであるポリペプチドなど、本発明のポリペプチドに特異的であり、そして他のタンパク質とは交差反応しない。本明細書に記載するようなサイピン・ポリペプチド、断片、変異体およびサイピン融合ポリペプチドを、それと免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用することが可能である。

40

【 0 1 0 7 】

本明細書に記載するポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチドなどは、サイピンと特異的に結合する抗体の形成を誘発する抗原決定基またはエピトープを含有する。サイピ

50

ン特異的抗体は、他の既知のセルピンと結合せず、すなわちこれらの抗体は、その超可変領域結合部位を介して、SCCA-1、SCCA-2、ハーピンまたはマスピンなどのオブセルピンと結合しない。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖でもまたはコンホメーション的 (conformational) (断続的) でもどちらでもよい。直鎖エピトープは、該ポリペプチドのアミノ酸の単一の部分で構成されるが、コンホメーション的または断続的エピトープは、ポリペプチドフォールディングに際してごく近接する、ポリペプチド鎖の異なる領域由来のアミノ酸部分で構成される (Janeway および Travers, Immunobiology 3:9 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996))。フォールディングしたポリペプチドは複雑な表面を有するため、利用可能なエピトープの数は非常に多い; が、ポリペプチドのコンホメーションおよび立体障害のため、実際にエピトープに結合する抗体の数は、利用可能なエピトープの数より少ない (Janeway および Travers, Immunobiology 2:14 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996))。エピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によって同定してもよい。したがって、本発明の1つの側面は、サイピンの抗原性エピトープに関する。こうしたエピトープは、以下にさらに詳細に記載するように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。さらに、本発明のポリペプチド由来のエピトープは、アッセイにおいて研究試薬として、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマの上清などの物質から、特異的に結合する抗体を精製するために、使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学または酵素的切断、あるいは組換えDNA技術の使用など、当該技術分野に公知の技術を用いて、産生可能である。

10

20

【0108】

配列番号2に示すサイピン・ポリペプチドまたはその下位部分は、サイピン特異的抗体を作成するのに適したタンパク質を提供する。この目的のため、配列番号2の少なくとも15アミノ酸を含んでなる連続セグメントを用いる。サイピン特異的抗体を作成するのに有用なサイピンの特定の下位領域には、配列番号2のアミノ酸61~107、108~373および374~395が含まれる。

【0109】

本発明のポリペプチドのエピトープに誘発可能な抗体に関しては、エピトープが単離されていてもまたはポリペプチドの一部のままであっても、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のどちらも、慣用的技術によって調製可能である。例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennetら (監修), Plenum Press, ニューヨーク (1980); および Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow および Land (監修), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (1988); Kohler および Milstein (米国特許第4,376,110号); ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozborら, 1984, J. Immunol. 133:3001-3005; Coleら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030); および EBVハイブリドーマ技術 (Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) を参照されたい。本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマは、慣用的技術によって産生しそして同定することが可能である。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitro または in vivo で培養可能である。in vivo では高力価でmAbが産生されるため、これが現在好ましい産生法である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物を、少なくとも1つのサイピン特異的エピトープを含むのに

30

40

50

十分に大きいサイピン・ポリペプチドで免疫し；免疫された動物から脾臓細胞を採取し；前記脾臓細胞を骨髓腫細胞株に融合させ、それによりハイブリドーマ細胞を生成し；そしてポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含んでなる。好ましい態様において、抗体は天然サイピンに結合するであろう。

【0110】

別の好ましい態様において、抗体は、サイピンおよびそのプロテアーゼ標的間に形成される複合体に特有のエピトープに特異的に結合するであろう。こうした複合体に特異的な抗体は、サイピンおよびそのプロテアーゼ標的間に形成される複合体を抗原として用いることによって作成する。こうした抗体は、組織、細胞、血清または細胞外マトリックスにおいて、こうした複合体の存在を検出するアッセイにおいて、有用である。

10

【0111】

抗体産生のため、1以上の以下：サイピン・ポリペプチド、サイピン・ポリペプチドの断片、サイピン・ポリペプチドの機能的同等物、またはサイピン・ポリペプチドの突然変異体型を注射することによって、多様な宿主動物を免疫することが可能である。こうした宿主動物には、限定されるわけではないが、ウサギ、モルモット、マウス、およびラットが含まれる。宿主種に応じて、多様なアジュバントを用いて、免疫学的反応を増加させることが可能であり、こうしたアジュバントには、限定されるわけではないが、フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオンなどの界面活性物質、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペット（keyhole limpet）ヘモシアニン、ジニトロフェノール、並びにBCG（カルメット・گران桿菌（baccille Calmette - Guérin））および坐瘡プロピオンバクテリウム（Corynebacterium parvum）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。こうしたモノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、およびそのいかなるサブクラスも含む、いかなる免疫グロブリンクラスのものであってもよい。

20

【0112】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を共にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術が使用可能である（Takedaら，1985，Nature，314：452-454；Morrisonら，1984，Proc Natl Acad Sci USA 81：6851-6855；Boulianneら，1984，Nature 312：643646；Neubergerら，1985，Nature 314：268-270）。キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、ブタmAbに由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどである。本発明のモノクローナル抗体にはまた、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型も含まれる。こうしたヒト化抗体は、既知の技術によって調製可能であり、そして抗体をヒトに投与した際、減少した免疫原性という利点を提供する。1つの態様において、ヒト化モノクローナル抗体は、ネズミ抗体の可変領域（またはその抗原結合部位のみ）およびヒト抗体由来の定常領域を含んでなる。あるいは、ヒト化抗体断片は、ネズミモノクローナル抗体の抗原結合部位およびヒト抗体由来の可変領域断片（抗原結合部位を欠く）と共に定常領域を含んでもよい。キメラおよびさらなる操作モノクローナル抗体の産生法には、Riechmannら（Nature 332：323，1988）、Liuら（PNAS 84：3439，1987）、Larrickら（Bio/Technology 7：934，1989）、並びにWinterおよびHarris（TIPS 14：139，Can，1993）に記載されるものが含まれる。ヒト化抗体に有用な技術は、米国特許6,054,297にも論じられる。トランスジェニック的に抗体を生成する方法は、GB 2,272,440、米国特許第5,569,825号および第5,545,806号、並びに関連特許に見出すことが可能である。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒトであるかまたはヒト化されており；こうしたヒ

30

40

50

トまたはヒト化抗体を生成する技術もまた公知であり、そして例えば Medarex Inc (ニュージャージー州プリンストン) および Abgenix Inc. (カリフォルニア州フレモント) から商業的に入手可能である。別の好ましい態様において、ヒトで使用するための完全ヒト抗体は、ヒト抗体可変ドメインのファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって産生する (Vaughanら, 1998, Nat Biotechnol. 16(6): 535-539; および米国特許第5,969,108号)。

【0113】

特異的エピトープを認識する抗原結合抗体断片は、既知の技術によって生成可能である。例えば、こうした断片には、限定されるわけではないが：抗体分子のペプシン消化によって産生可能な F(ab')₂ 断片、および (ab')₂ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって産生可能な Fab 断片が含まれる。あるいは、Fab 発現ライブラリーを構築し (Huseら, 1989, Science, 246: 1275-1281)、所望の特異性を持つモノクローナル Fab 断片の迅速でそして容易な同定を可能にしてもよい。一本鎖抗体の産生に関して記載される技術 (米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242: 423-426; Hustonら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; および Wardら, 1989, Nature 334: 544-546) を適応させ、サイピン遺伝子産物に対する一本鎖抗体を産生することもまた可能である。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFc領域の重鎖および軽鎖断片を連結して一本鎖抗体を生じることによって形成する。こうした一本鎖抗体はまた、例えばHIV感染における遺伝子治療に関する Marascoら (J. Immunol. Methods 231: 223-238, 1999) に記載されるように、細胞内でも (すなわち「細胞内発現抗体 (intrabodies)」として) 有用である可能性がある。さらに、当業者に公知の技術を用いて、今度はサイピン・ポリペプチドに対する抗体を利用して、サイピン・ポリペプチドを「模倣」し、そしてサイピン・ポリペプチドに結合可能なアイディオタイプ抗体を生成することが可能である (例えば Greenspan & Bona, 1993, FASEB J 7(5): 437-444; および Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8): 2429-2438 を参照されたい)。

【0114】

本発明のポリペプチドと免疫反応性である抗体には、二特異性抗体 (すなわち第一の抗原結合ドメインを介して本発明のポリペプチドとも免疫反応性であり、そしてまた、第二の抗原結合ドメインを介して異なるポリペプチドと免疫反応性である抗体) が含まれる。多様な二特異性抗体が調製され、そして in vitro および in vivo 両方で有用であることが見出されてきている (例えば米国特許5,807,706; 並びに Cao および Suresh, 1998, Bioconjugate Chem 9: 635-644 を参照されたい)。二特異性抗体を調製する多くの方法が当該技術分野に知られ、これらには、2つの異なるハイブリドーマを融合させることによって形成するクアドローマ (quadroma)、およびハイブリドーマをリンパ球と融合させることによって形成するトリオーマなどのハイブリッド・ハイブリドーマの使用が含まれる (Milstein および Cuello, 1983, Nature 305: 537-540; 米国特許4,474,893 および米国特許6,106,833)。米国特許6,060,285は、二特異性抗体の産生法を開示し、この方法において、少なくとも第一の特異性を有する抗体の軽鎖および重鎖の可変部分の遺伝子を、第二の特異性を有する抗体を分泌するハイブリドーマ細胞にトランスフェクションする。抗体断片の化学的カップリングもまた、2つの異なる抗原に対する特異性を有する抗原結合分子を調製するのに用いられてきている (Brennanら, 1985, Science 229: 81-83; Glennieら, J. Immunol., 1987, 139: 2367-2375; および米国特許6,010,902)。二特異性抗体はまた、例えば Kostelny

ら (J. Immunol. 148:1547-4553; 1992) に記載されるように、Fos および Jun タンパク質 (優先的にヘテロ二量体を形成する) 由来のロイシンジッパー部分を用いることによって、組換え手段を介しても産生可能である。米国特許 5,582,996 は、二特異性抗体産生において、ヘテロ二量体形成を促進するための相補的相互作用ドメイン (ロイシンジッパー部分または他の錠および鍵相互作用ドメイン構造など) の使用を開示する。四価二特異性分子は、米国特許 5,959,083 に記載されるように、抗体の F(ab')₂ 断片の重鎖をコードする DNA を、第二の F(ab')₂ 分子の重鎖をコードする DNA (CH1 ドメインが CH3 ドメインと交換されている)、または抗体の一本鎖 FV 断片をコードする DNA と融合させることによって調製可能である。生じた融合遺伝子の哺乳動物細胞における発現は、対応する軽鎖の遺伝子と共に、選択される抗原に対して特異性を有する、四価二特異性分子を生じる。二特異的抗体はまた、米国特許 5,807,706 に記載されるようにも産生可能である。一般的に、該方法は、第一のポリペプチドの界面で、隆起 (小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖と交換することによって構築する) を、そして第二のポリペプチドの界面で、対応する空洞 (大きいアミノ酸側鎖をより小さいものと交換することによって調製する) を導入することを伴う。さらに、一本鎖可変断片 (sFv) は、2つの可変ドメインを共有結合することによって調製され; 生じた抗体断片は、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて、二量体または三量体を形成可能である (Krotter, 1997, Protein Engineering 10:423-433)。

10

20

30

40

50

【0115】

こうした抗体を同定可能なスクリーニング法が公知であり、そして例えば免疫アフィニティークロマトグラフィーを伴う可能性がある。抗体は、アゴニスト (すなわちリガンド模倣) 特性に関してスクリーニング可能である。アゴニスト抗体を用いて、サイピンが仲介する刺激経路または細胞間コミュニケーションまたはサイピンが仲介する他の生理学的現象を誘導可能である。

【0116】

サイピン結合パートナーへの本発明のサイピン・ポリペプチドの結合を遮断可能なこれらの抗体を用いて、こうした結合から生じ、サイピンが仲介する現象を阻害可能である。こうした遮断抗体は、サイピンの、トリプシン様プロテアーゼへの結合を阻害する能力に関して、抗体を試験することによるなど、いかなる適切なアッセイ法を用いて同定することも可能である。あるいは、遮断抗体は、標的へのサイピンの結合から生じる生物学的影響を阻害する能力に関するアッセイにおいて、同定可能である。こうした抗体は、in vitro 法で使用可能であるし、または in vivo で投与して、サイピンによって仲介される生物学的活性を阻害することが可能である。このように、サイピン結合パートナーとサイピンの相互作用によって (直接または間接的に) 引き起こされるかまたは悪化される障害を治療することが可能である。療法は、サイピンが仲介する生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、哺乳動物に in vivo 投与することを伴う。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。1つの態様において、抗原結合抗体断片が使用される。サイピンに対して向けられる抗体、および生理学的に許容しうる希釈剤、賦形剤、またはキャリアーを含んでなる組成物を、本明細書に提供する。サイピン・ポリペプチドを含有する組成物に関して、こうした組成物の適切な構成要素を以下に記載する。

【0117】

本明細書にやはり提供するのには、抗体に付着した検出可能 (例えば診断用) 剤または療法剤を含んでなるコンジュゲートである。こうした剤の例を上に記載する。該コンジュゲートは、in vitro または in vivo 法に使用を見出す。本発明の抗体はまた、in vitro または in vivo いずれかの、サイピン・ポリペプチドまたはその断片の存在を検出するアッセイにおいても使用可能である。抗体はまた、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、本発明のポリペプチドまたは断片を精製する際にも使用可能である。

【0118】

サイピン・ポリペプチドと相互作用する化合物の合理的設計

合理的薬剤設計の目的は、生物学的に活性である目的のポリペプチドまたはそれらが相互作用する小分子、例えば阻害剤、アゴニスト、アンタゴニスト等の構造的類似体を產生することである。このアプローチを用いて、ポリペプチドの、より活性であるかまたは安定な型である薬剤、あるいは *in vivo* でポリペプチドの機能を増進するかまたは該機能に干渉する薬剤を形作ることが可能である (Hodgson J (1991) Biotechnology 9:19-21)。1つのアプローチにおいて、目的のポリペプチド、またはポリペプチド-阻害剤複合体の三次元構造を、X線結晶学によって、核磁気共鳴によって、またはコンピューター相同性モデリングによって、あるいは最も典型的には、これらのアプローチの組み合わせによって、決定する。構造を解明し、そして分子の活性部位(類)を決定するため、ポリペプチドの形状および荷電両方を確定しなければならない。より頻繁でないが、相同ポリペプチドの構造に基づいてモデリングすることによって、ポリペプチドの構造に関する有用な情報が得られる可能性がある。どちらの場合も、適切な構造情報を用いて、類似のセルピン様分子を設計するか、有効な阻害剤を同定するか、またはセルピンに結合可能である小分子を同定する。合理的薬剤設計の有用な例には、Braxton SおよびWells JA (1992 Biochemistry 31:7796-7801)に示されるように、改善された活性または安定性を有する分子、あるいはAthauda SBら (1993 J Biochem 113:742-746)に示されるように、天然ペプチドの阻害剤、アゴニスト、またはアンタゴニストとして作用する分子が含まれる可能性がある。アゴニストまたは阻害剤設計およびアゴニスト-サイピンまたは阻害剤-サイピン・ポリペプチド相互作用を補助するための、分子モデリングソフトウェア系における、サイピン・ポリペプチド構造情報の使用もまた、本発明に含まれる。本発明の特定の方法は、基質のありうる結合部位に関して、サイピン・ポリペプチドの三次元構造を解析し、予測される反応部位を取り込む新規分子を合成し、そして本明細書にさらに記載するように、新規分子をアッセイすることを含んでなる。

10

20

【0119】

本明細書にさらに記載するような、機能アッセイによって選択される、標的特異的抗体を単離し、そしてその後、結晶構造を解析することもまた可能である。このアプローチによって、原則として、続く薬剤設計の基礎とすることが可能なファーマコア (pharmacore) を得る。機能する薬理学的活性抗体に対する抗イディオタイプ抗体 (anti-id) を生成することによって、ポリペプチド結晶学を完全に回避することが可能である。鏡像の鏡像として、anti-idの結合部位は、元来の抗原の類似体であると予測されるであろう。次いで、anti-idを用いて、化学的または生物学的に產生したペプチドのバンクからペプチドを同定し、そして単離することが可能である。その後、単離ペプチドは、ファーマコアとして働くであろう。

30

【0120】

サイピン・ポリペプチド活性のアッセイ

本発明の精製サイピン・ポリペプチド (ポリペプチド、断片、変異体、オリゴマー、および他の型を含む) は、多様なアッセイで有用である。例えば、本発明のサイピン分子を用いて、サイピン・ポリペプチドの結合パートナーが同定可能であり、この結合パートナーをまた用いて、多様な生理学的現象が変調可能である。あるいは、これらを用いて、発生、組織リモデリングなどを変調する、非結合パートナー分子または物質が同定可能である。

40

【0121】

結合パートナーを同定するアッセイ。サイピン・ポリペプチドおよびその断片を用いて、結合パートナーを同定可能である。例えば、これらは、慣用的結合アッセイなどの、いかなる適切なアッセイにおいても、候補結合パートナーに結合する能力に関して、試験可能である。例えば、サイピン・ポリペプチドを検出可能試薬 (例えば放射性核種、発色団、および比色または蛍光定量反応を触媒する酵素等) で標識してもよい。標識ポリペプチド

50

を、サイピンと相互作用する能力を有すると推測される候補セリンプロテアーゼと接触させる。特異的結合が生じると、標識サイピンはプロテアーゼと熱安定性複合体を形成すると予測される。これらの複合体は、ゲル電気泳動またはカラムクロマトグラフィーを使用可能な慣用法いずれかによって、検出可能である。

【0122】

サイピン・ポリペプチドへの結合に関してアッセイ可能な化合物には、限定されるわけではないが、Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス)、Arqule (マサチューセッツ州ウォバーン)、Enzymed (アイオワ州アイオワシティ)、Maybridge Chemical Co. (英国・コーンウォール州トレビレット)、MDS Panlabs (ワシントン州ボセル)、Pharmacopeia (ニュージャージー州プリンストン)、およびTrega (カリフォルニア州サンディエゴ)などの企業から - しばしば大きいコンビナトリアルケミストリー化合物「ライブラリー」の一部として - 商業的に入手可能なものなどの、小有機分子が含まれる。これらのアッセイを用いてスクリーニングするのに好ましい小有機分子は、通常、10 KDa分子量未満であり、そして細胞侵入 (penetration) を増進し、分解に抵抗し、そして / またはその生理学的半減期を延長する、いくつかの物理化学的および薬理学的特性を所持することが可能である (Gibbs, J., 1994, Pharmaceutical Research in Molecular Oncology, Cell 79 (2): 193 - 198)。天然産物、無機化学薬品、並びにタンパク質および毒素などの生物学的に活性である物質を含む化合物もまた、サイピン・ポリペプチドに結合する能力に関して、これらの方法を用いてアッセイすることが可能である。

10

20

【0123】

酵母2ハイブリッドまたは「相互作用トラップ」アッセイ。サイピン・ポリペプチドが、別のポリペプチドに結合するか、または潜在的に結合する場合、サイピン・ポリペプチドをコードする核酸はまた、相互作用トラップアッセイ (例えばGyurisら, Cell 75: 791 - 803 (1993) に記載されるものなど) で使用して、結合が起こる他のポリペプチドをコードする核酸を同定するか、または結合相互作用の阻害剤を同定することも可能である。これらの結合相互作用に関与するポリペプチドはまた、結合相互作用のペプチドまたは小分子阻害剤またはアゴニストに関して、スクリーニングするのにも使用可能である。

30

【0124】

競合的結合アッセイ。別の種類の適切な結合アッセイは、競合的結合アッセイである。例えば、変異体の生物学的活性は、変異体が、候補結合パートナーへの結合に関して、天然ポリペプチドと競合する能力に関してアッセイすることによって、決定可能である。競合的結合アッセイは、慣用的方法論によって実行可能である。競合的結合アッセイに使用可能な試薬には、放射標識サイピン、およびサイピン (内因性または組換え) を発現する、損なわれていない細胞が含まれる。例えば、放射標識可溶性サイピン断片を用いて、標的プロテアーゼへの結合に関して、天然サイピンと競合させることが可能である。

【0125】

細胞増殖、細胞死、細胞分化、および細胞接着アッセイ。

40

本発明のポリペプチドは、細胞増殖 (誘導または阻害いずれか) または細胞分化 (誘導または阻害いずれか) 活性を示す可能性があり、あるいは特定の細胞集団でサイトカイン産生を誘導する可能性がある。現在までに発見された多くのポリペプチド因子は、1以上の因子依存細胞増殖アッセイにおいて、こうした活性を示してきており、そしてしたがって、該アッセイは、細胞刺激活性の好適な確認として役立つ。本発明のポリペプチドの活性は、限定なしに、32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+ (プレB M+)、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTL2、TF-1、Mo7eおよびCMKを含む細胞株に関するいくつかの日常的な因子依存細胞増殖アッセイのいずれか1つによって立証される。本発明のサイピン・ポリペプチドの活性は、他の手段の中でも、以下の方法によって測定可能である：

50

【0126】

T細胞または胸腺細胞増殖のためのアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (pp. 3.1 - 3.19: In vitro assays for mouse lymphocyte function; 第7章: Immunologic studies in humans); Takaiら, J. Immunol. 137: 3494 - 3500, 1986; Bertagnoliら, J. Immunol. 145: 1706 - 1712, 1990; Bertagnoliら, Cellular Immunology 133: 327 - 341, 1991; Bertagnoliら, J. Immunol. 149: 3778 - 3783, 1992; Bowmanら, J. Immunol. 152: 1756 - 1761, 1994. に記載されるものが含まれる。

【0127】

脾臓細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖に関するアッセイには、限定なしに：KruisbeekおよびShevach, 1994, Polyclonal T cell stimulation, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol. 1 pp. 3.12.1 - 3.12.14, John Wiley and Sons, トロント; およびSchreiber, 1994, Measurement of mouse and human interferon gamma, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol. 1 pp. 6.8.1 - 6.8.8, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。

【0128】

造血およびリンパ球新生細胞の増殖および分化に関するアッセイには、限定なしに：Bottomlyら, 1991, Measurement of human and murine interleukin 2 and interleukin 4, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol. 1 pp. 6.3.1 - 6.3.12, John Wiley and Sons, トロント; deVriesら, J Exp Med 173: 1205 - 1211, 1991; Moreauら, Nature 336: 690 - 692, 1988; Greenbergerら, Proc Natl Acad Sci USA 80: 2931 - 2938, 1983; Nordan, 1991, Measurement of mouse and human interleukin 6, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol. 1 pp. 6.6.1 - 6.6.5, John Wiley and Sons, トロント; Smithら, Proc Natl Acad Sci USA 83: 1857 - 1861, 1986; Bennettら, 1991, Measurement of human interleukin 11, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol. 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, トロント; Ciarlettaら, 1991, Measurement of mouse and human Interleukin 9, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol. 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。

【0129】

抗原に対するT細胞クローン反応に関するアッセイ (例えば、増殖およびサイトカイン産生を測定することによる、APC - T細胞相互作用に影響を与えると共に直接のT細胞効

果に影響を与えるポリペプチドを同定するであろうもの)には、限定なしに: Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章: In vitro assays for mouse lymphocyte function; 第6章: Cytokines and their cellular receptors; 第7章: Immunologic studies in humans); Weinbergerら, Proc Natl Acad Sci USA 77: 6091-6095, 1980; Weinbergerら, Eur. J. Immunol. 11: 405-411, 1981; Takaiら, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takaiら, J. Immunol. 140: 508-512, 1988に記載されるものが含まれる。 10

【0130】

胸腺細胞または脾臓細胞細胞傷害性に関するアッセイには、限定なしに、Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; 第7章, Immunologic studies in Humans); Herrmannら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2488-2492, 1981; Herrmannら, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handaら, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takaiら, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takaiら, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Herrmannら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2488-2492, 1981; Herrmannら, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handaら, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takaiら, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bowmanら, J. Virology 61: 1992-1998; Takaiら, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnoliら, Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Brownら, J. Immunol. 153: 3079-3092, 1994に記載されるものが含まれる。 20 30

【0131】

T細胞依存免疫グロブリン反応およびアイソタイプスイッチングに関するアッセイ(例えば、T細胞依存抗体反応を変調し、そしてTh1/Th2プロファイルに影響を及ぼすポリペプチドを同定するであろうもの)には、限定なしに: Maliszewski, J. Immunol 144: 3028-3033, 1990; 並びに Mondおよび Brunswick, 1994, Assays for B cell function: in vitro antibody production, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。 40

【0132】

混合リンパ球反応(MLR)アッセイ(例えば、主にTh1およびCTL反応を生じるポリペプチドを同定するであろうもの)には、限定なしに: Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章、In Vitro assays for Mouse Lymphoc 50

y te Function 3.1 - 3.19 ; 第7章、Immunologic studies in Humans) ; Takaiら, J. Immunol. 137 : 3494 - 3500, 1986 ; Takaiら, J. Immunol. 140 : 508 - 512, 1988 ; Bertagnoliら, J. Immunol. 149 : 3778 - 3783, 1992に記載されるものが含まれる。

【0133】

樹状細胞依存アッセイ (例えば、未処置T細胞を活性化する樹状細胞に発現されるポリペプチドを同定するであろうもの) には、限定なしに : Gueryら, J. Immunol 134 : 536 - 544, 1995 ; Inabaら, J Exp Med 173 : 549 - 559, 1991 ; Macatoniaら, J Immunol 154 : 5071 - 5079, 1995 ; Porgadorら, J Exp Med 182 : 255 - 260, 1995 ; Nairら, J Virology 67 : 4062 - 4069, 1993 ; Huangら, Science 264 : 961 - 965, 1994 ; Macatoniaら, J Exp Med 169 : 1255 - 1264, 1989 ; Bhardwajら, J Clin Invest 94 : 797 - 807, 1994 ; および Inabaら, J Exp Med 172 : 631 - 640, 1990に記載されるものが含まれる。

【0134】

リンパ球生存 / アポトーシスに関するアッセイ (例えば、スーパー抗原誘導後のアポトーシスを防ぐポリペプチドおよびリンパ球恒常性を制御するポリペプチドを同定するであろうもの) には、限定なしに : Darzynkiewiczら, Cytometry 13 : 795 - 808, 1992 ; Gorczycaら, Leukemia 7 : 659 - 670, 1993 ; Gorczycaら, Cancer Research 53 : 1945 - 1951, 1993 ; Itohら, Cell 66 : 233 - 243, 1991 ; Zacharchuk, J Immunol 145 : 4037 - 4045, 1990 ; Zamaら, Cytometry 14 : 891 - 897, 1993 ; Gorczycaら, International Journal of Oncology 1 : 639 - 648, 1992に記載されるものが含まれる。

【0135】

T細胞拘束および発生の初期段階に影響を与えるポリペプチドに関するアッセイ には、限定なしに : Anticaら, Blood 84 : 111 - 117, 1994 ; Finera, Cell Immunol 155 : 111 - 122, 1994 ; Galyら, Blood 85 : 2770 - 2778, 1995 ; Tokiら, Proc Natl Acad Sci USA 88 : 7548 - 7551, 1991に記載されるものが含まれる。

【0136】

胚性幹細胞分化に関するアッセイ (例えば、胚性分化造血に影響を与えるポリペプチドを同定するであろうもの) には、限定なしに : Johanssonら Cellular Biology 15 : 141 - 151, 1995 ; Kellerら, Molecular and Cellular Biology 13 : 473 - 486, 1993 ; McClanahanら, Blood 81 : 2903 - 2915, 1993に記載されるものが含まれる。

【0137】

幹細胞生存および分化に関するアッセイ (例えば、リンパ造血を制御するポリペプチドを同定するであろうもの) には、限定なしに : Methylcellulose colony forming assays, Freshney, 1994, Culture of Hematopoietic Cells 中, Freshneyら監修 pp. 265 - 268, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク ; Hirayamaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 5907 - 5911, 1992 ; Primitive hematopoi

etic colony forming cells with high proliferative potential, McNieceおよびBriddell, 1994, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 pp. 23 - 39, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク; Nebenら, Experimental Hematology 22: 353 - 359, 1994; Ploemacher, 1994, Cobblestone area forming cell assay, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 pp. 1 - 21, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク; Spooncerら, 1994, Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 pp. 163 - 179, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク; Sutherland, 1994, Long term culture initiating cell assay, Culture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監修 Vol pp. 139 - 162, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨークに記載されるものが含まれる。

10

【0138】

組織生成活性に関するアッセイには、限定なしに：国際特許公報第WO95/16035号（骨、軟骨、腱）；国際特許公報第WO95/05846号（神経、ニューロン性）；国際特許公報第WO91/07491号（皮膚、内皮）に記載されるものが含まれる。創傷治癒活性に関するアッセイには、限定なしに：EaglststeinおよびMertz, J. Invest. Dermatol 71: 382 - 84 (1978)に修飾されるような、Winter, Epidermal Wound Healing, pp. 71 - 112 (MaibachおよびRovee監修), Year Book Medical Publishers, Inc., シカゴに記載されるものが含まれる。

20

【0139】

アクチビン/インヒピン活性に関するアッセイには、限定なしに：Valeら, Endocrinology 91: 562 - 572, 1972; Lingら, Nature 321: 779 - 782, 1986; Valeら, Nature 321: 776 - 779, 1986; Masonら, Nature 318: 659 - 663, 1985; Forageら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3091 - 3095, 1986に記載されるものが含まれる。

30

【0140】

細胞運動および接着に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第6.12章, Measurement of alpha and beta chemokines 6.12.1 - 6.12.28); Taubら J. Clin. Invest. 95: 1370 - 1376, 1995; Lindら APMIS 103: 140 - 146, 1995; Mullerら Eur. J. Immunol. 25: 1744 - 1748; Gruberら J Immunol. 152: 5860 - 5867, 1994; Johnstonら J Immunol. 153: 1762 - 1768, 1994に記載されるものが含まれる。

40

【0141】

止血および血栓溶解活性に関するアッセイには、限定なしに：Linnetら, J. Clin. Pharmacol. 26: 131 - 140, 1986; Burdickら, Thrombosis Res. 45: 413 - 419, 1987; Humph

50

reyら, Fibrinolysis 5:71-79(1991); Schaub, Prostaglandins 35:467-474, 1988に記載されるものが含まれる。

【0142】

受容体-リガンド活性に関するアッセイには、限定なしに: Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第7.28章, Measurement of cellular adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22), Takaiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6864-6868, 1987; Biererら, J. Exp. Med. 168:1145-1156, 1988; Rosensteinら, J. Exp. Med. 169:149-160 1989; Stolttenborgら, J. Immunol. Methods 175:59-68, 1994; Stittら, Cell 80:661-670, 1995に記載されるものが含まれる。

【0143】

カドヘリン接着および浸潤抑制因子活性に関するアッセイには、限定なしに: Hortschら J Biol Chem 270(32):18809-18817, 1995; Miyakiら Oncogene 11:2547-2552, 1995; Ozawaら Cell 63:1033-1038, 1990に記載されるものが含まれる。

【0144】

サイピン・ポリペプチドおよび核酸の診断用および他の使用

本発明が提供するサイピン・ポリペプチドをコードする核酸は、多くの診断または他の有用な目的に使用可能である。本発明の核酸は、解析、性質決定または療法使用のために組換えサイピン・ポリペプチドを発現するため; 対応するポリペプチドを(恒常的に、あるいは組織分化もしくは発生の特定の時期にまたは疾患状態において)優先的に発現する組織のマーカーとして; サザンゲル上の分子量マーカーとして; 染色体18を同定するかまたは未知の遺伝子位をマッピングするための染色体マーカーまたはタグとして(標識した場合); 潜在的な遺伝子障害を同定するために患者における内因性DNA配列と比較するため; ハイブリダイズしそしてしたがって新規関連DNA配列を発見するためのプローブとして; 遺伝子フィンガープリンティングのためのPCRプライマーを導くための情報供給源として; 他の新規核酸を発見する過程において、既知の配列を「取り去る(subtract-out)」ためのプローブとして; 発現パターンの検査のためを含む、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着するオリゴマーを選択し、そして作成するため; DNA免疫技術を用いて、抗ポリペプチド抗体を作成するため; 抗DNA抗体を作成するかまたは別の免疫反応を誘発するための抗原として、そして遺伝子治療のために使用可能である。

【0145】

サイピン・ポリペプチドおよび断片化ポリペプチドの使用には、限定されるわけではないが、以下が含まれる: ポリペプチドを精製し、そしてその活性を測定すること; 搬送剤; 療法および研究用試薬; 分子量および等電点電気泳動マーカー; ペプチド断片化用の対照; 未知のポリペプチドの同定; 並びにサイピン特異的抗体の調製。これらの使用に適したいずれかのまたはすべての核酸は、製品として商品化するため、試薬等級材料またはキット形式に発展させることが可能である。上に列挙する使用を実行する方法は、当業者に公知である。こうした方法を開示する参考文献には、限定なしに、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E.F. FritschおよびT. Maniatis監修, 1989、および“Methods in Enzymology: Guide to Mole

cular Cloning Techniques", Academic Press, Berger, S. L. および A. R. Kimmel 監修, 1987 が含まれる。

【0146】

プローブおよびプライマー。開示するサイピン核酸、およびその断片の組み合わせの使用の中に、プローブまたはプライマーとしての断片の使用がある。こうした断片は、一般的に、DNA配列の少なくとも約17の隣接するヌクレオチドを含んでなる。他の態様において、DNA断片は、DNA配列の少なくとも30、または少なくとも60の隣接するヌクレオチドを含んでなる。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrookら、1989に示され、そして上に詳細に記載している。遺伝暗号の知識を、上に示すアミノ酸配列と組み合わせて用い、縮重オリゴヌクレオチドの組を調製することが可能である。こうしたオリゴヌクレオチドは、例えばDNA断片を単離し、そして増幅するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において、プライマーとして有用である。特定の態様において、非ヒト遺伝子ライブラリー用のプローブとして、縮重プライマーを使用することが可能である。こうしたライブラリーには、限定されるわけではないが、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、およびエレクトロニックEST(発現配列タグ)またはDNAライブラリーさえ含まれるであろう。その後、この方法で同定された相同配列をプローブとして用いて、非ヒト・サイピン相同体を同定するであろう。

10

【0147】

染色体マッピング。当業者は、サイピン・ポリペプチドをコードする核酸、並びにこれらの核酸の開示する断片および組み合わせを、ヒト18q21.3の染色体マーカーとして用いることが可能である。さらに、本発明の核酸またはその断片を位置マーカーとして用いて、未知の位置の他の遺伝子をマッピングすることが可能である。有用な技術には、限定されるわけではないが、放射ハイブリッドマッピング(高解像度)、染色体伸展(spread)に対するin situハイブリダイゼーション(中程度の解像度)、および個々のヒト染色体を含有するハイブリッド細胞株に対するサザンブロットハイブリダイゼーション(低解像度)などの多様な公知の技術におけるプローブとして、オリゴヌクレオチドを含むサイピン核酸配列または部分を使用することが含まれる。

20

【0148】

放射ハイブリダイゼーションのため、まず、93の放射ハイブリッドのWhitehead Institute/MIT Center for Genome Research Genebridge 4パネルを用い、PCRを行う。この方法のため、目的の遺伝子の推定上のエクソン内にあり、そしてヒトゲノムDNAから産物を増幅するが、ハムスターゲノムDNAを増幅しないPCRプライマーを用いる。PCRの結果をデータベクトルに変換し、これをワールドワイドウェブ上のWhitehead/MIT放射マッピングサイト、seq.wi.mit.eduに提出する。該データはスコア化され、そして放射ハイブリッドマップ上の既知の配列タグ部位(STS)マーカーに比した染色体割り当ておよび配置が提供される。放射ハイブリッドマッピングに関するさらなる情報はまた、Whitehead/MITウェブサイト、genome.wi.mit.eduでもアクセス可能である。

30

40

【0149】

診断法および遺伝子治療。当業者は、サイピン・ポリペプチドをコードする核酸、および開示する断片、並びにこれらの核酸の組み合わせを用い、公知の技術を用いて、サイピン遺伝子またはその変異体と関連する異常を解析することが可能である。これによって、このマーカーが再編成されているかまたは欠失している状態を識別することが可能になり、そして特定の医学的障害を診断するためにこの情報が使用可能である。さらに、本発明の核酸に対応する遺伝子の不全または不十分な量によって(直接または間接的に)仲介されるいかなる障害に対する治療を開発するのにも、サイピンDNAが使用可能である。天然ヌクレオチド配列の本明細書の開示により、不全遺伝子の検出、および当該技術分野に知

50

られる遺伝子治療技術を用いて、正常サイピン遺伝子でのその交換が可能になる。不全遺伝子は、*in vitro* 診断アッセイにおいて、そして本明細書に開示する天然ヌクレオチド配列と、サイピン遺伝子に不全を宿すると推測されるヒト由来の遺伝子のものとを比較することによって、検出可能である。

【0150】

結合パートナーに関するスクリーニング法。サイピン・ポリペプチドおよびその断片を、方法における試薬として用いて、サイピンに阻害される標的プロテアーゼなどのサイピン結合パートナーに関してスクリーニングするか、または該パートナーを同定することが可能である。例えば、精製組換えサイピン・ポリペプチドを固体支持体材料に付着させて、そしてアフィニティークロマトグラフィーと類似の方式で、プロテアーゼ結合パートナー（類）を捕捉する試薬として用いることが可能である。特定の態様において、慣用法によって、ポリペプチドを固体支持体に付着させる。一例として、ポリペプチドのアミノ酸側鎖上の官能基と反応するであろう官能基を含有するクロマトグラフィーカラムが入手可能である（Pharmacia Biotech, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ）。あるいは、サイピン/Fcポリペプチド（上に論じるようなもの）を、Fc部分との相互作用を通じて、プロテインAまたはプロテインG含有クロマトグラフィーカラムに付着させる。

10

【0151】

サイピン・ポリペプチドはまた、細胞表面上にサイピン結合パートナーを発現する細胞を同定するのに使用を見出す。精製サイピン・ポリペプチドを、カラムクロマトグラフィーマトリックスまたは類似の適切な支持体などの固相に結合させる。例えば磁気微小球体をポリペプチドでコーティングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器に保持することが可能である。潜在的な結合パートナー発現細胞を含有する細胞混合物の懸濁物を、ポリペプチドを有する固相と接触させる。細胞表面上に結合パートナーを発現する細胞は固定ポリペプチドに結合し、そして未結合細胞は洗い流される。あるいは、サイピン・ポリペプチドを検出可能部分にコンジュゲート化し、その後、結合パートナー発現に関して試験しようとする細胞とインキュベーションする。インキュベーション後、未結合標識物質を取り除き、そして細胞上の検出可能部分の存在または非存在を決定する。さらなるあるいは、結合パートナーを発現すると推測される細胞の混合物を、ビオチン化したポリペプチドとインキュベーションする。インキュベーション時間は、十分な結合を確実にするため、典型的には少なくとも連続1時間である。その後、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに、生じた混合物を通過させ、それによりアビジンに対するビオチンの高い親和性が、所望の細胞のビーズへの結合を提供する。アビジンでコーティングしたビーズの使用法が知られる（Berensonら, J. Cell. Biochem., 10D: 239, 1986を参照されたい）。非結合成分を取り除く洗浄、および結合細胞の遊離は、慣用法を用いて行う。いくつかの場合、結合パートナーに関してスクリーニングするか、または該パートナーを同定する上記の方法はまた、こうした結合パートナー分子またはそれらが発現する細胞などを用いるかまたは修飾して、単離するかまたは精製することが可能である。あるいは、これらの同じアッセイを用いて、細胞抽出物中のサイピン結合パートナーを検出することが可能である。

20

30

40

【0152】

生物学的活性の測定。サイピン・ポリペプチドはまた、結合親和性に関して、サイピン結合ポリペプチドの生物学的活性を測定するのに使用を見出す。したがって、ポリペプチドは、例えば異なる条件下でのポリペプチドの貯蔵寿命および安定性を監視するための、「品質保証」研究を行うものによって、使用可能である。例えば、ポリペプチドは、異なる温度で保管されているか、または異なる細胞種で産生された結合パートナーポリペプチドの生物学的活性を測定する、結合親和性研究に使用可能である。サイピン・ポリペプチドはまた、結合パートナーポリペプチドの修飾（例えば、化学的修飾、一部切除、突然変異等）後、生物学的活性が保持されているかどうか決定するのに使用可能である。修飾ポリペプチドの結合親和性を、非修飾結合ポリペプチドのものと比較して、結合ポリペ

50

チドの生物学的活性に対する該修飾のいかなる不利な影響も検出する。例えば研究に用いる前に、こうして結合ポリペプチドの生物学的活性を確かめることが可能である。

【0153】

キャリアーおよび搬送剤。該ポリペプチドはまた、付着する剤を、同定された結合パートナーを所持している細胞に搬送するためのキャリアーとしての使用も見出す。したがって、該ポリペプチドは、*in vitro*法または*in vivo*法において、診断用剤または療法剤をこうした細胞（または、細胞表面上に結合パートナーを発現することが見出された他の細胞種）に搬送するのに使用可能である。ポリペプチドに付着させてもよい検出可能（診断用）および療法剤には、限定されるわけではないが、毒素、他の細胞傷害性剤、薬剤、放射性核種、発色団、比色または蛍光定量反応を触媒する酵素等が、意図する適用にしたがって選択される特定の剤と共に含まれる。毒素の例は、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素A、リボソーム不活性化ポリペプチド、トリコセセンなどのマイコトキシン、並びにそれらの誘導体および断片（例えば一本鎖）である。診断使用に適した放射性核種には、限定されるわけではないが、 ^{123}I 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、および ^{76}Br が含まれる。療法使用に適した放射性核種の例は、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{77}Br 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{12}Bi 、 ^{109}Pd 、 ^{64}Cu 、および ^{67}Cu である。こうした剤は、いかなる適切な慣用法によって、ポリペプチドに付着させてもよい。ポリペプチドは、例えば、所望の剤上の官能基と反応し、共有結合を形成することが可能である、アミノ酸側鎖上の官能基を含んでなる。あるいは、ポリペプチドまたは剤を誘導体化し、所望の反応性官能基を生成するか、または付着させてもよい。誘導体化には、多様な分子をポリペプチドに付着させるのに利用可能である、二官能性カップリング試薬（*Pierce Chemical Company*、イリノイ州ロックフォード）の1つの付着を伴ってもよい。ポリペプチドを放射標識するいくつかの技術が知られる。例えば、適切な二官能キレート剤を用いることによって、放射性核種金属をポリペプチドに付着させることが可能である。こうしてポリペプチドおよび適切な診断用剤または療法剤を含んでなるコンジュゲート（好ましくは共有結合）を調製する。該コンジュゲートを、特定の適用に適した量で投与するか、または別の方式で使用する。

10

20

【0154】

サイピン・ポリペプチドおよびそのアンタゴニストでの疾患の治療

30

実施例6に示すように、サイピンmRNAは、皮膚で比較的高レベルに発現される。実施例6は、RNA解析前に、肺上皮細胞をIL-4およびIL-13の組み合わせに曝露すると、サイピン発現が選択的に誘導されることをさらに示す。アレルギーおよび他の肺疾患を含む、特定の疾患は、IL-4、IL-13および他のサイトカインレベルの上昇と関連し、そして組織破壊を引き起こす多様なプロテアーゼレベルの上昇とも関連する。

【0155】

したがって、本発明の1つの側面は、肺障害を有する患者においてプロテアーゼレベルを減少させるための、サイピンを含有する生理学的に許容しうる組成物を提供する。これらの組成物は、単独で、あるいは肺障害を治療するのに用いられる他の医薬品または治療と組み合わせて用いることが可能であるし、そして注入またはエアロゾル搬送によって肺に直接投与することが可能である。サイピンを投与することによって治療可能な肺障害には、喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺胞タンパク症、プレオマイシン誘導肺疾患および線維症、放射線誘導肺線維症、嚢胞性線維症、肺におけるコラーゲン集積、およびARDSが含まれる。サイピンを投与することによって治療可能な他の肺障害には、慢性気管支炎または肺気腫と関連する慢性閉塞性肺疾患（COPD）；嚢胞性線維症、特発性肺線維症および放射線誘導肺線維症などの線維性肺疾患；肺サルコイドーシスを含むサルコイドーシス；並びにアレルギー性鼻炎、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎および喘息を含むアレルギーが含まれる。

40

【0156】

サイピンを含有する組成物の投与はまた、限定されるわけではないが、疱疹状皮膚炎（デ

50

ューリング病)、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、じんま疹(慢性特発性じんま疹を含む)を含む多様な皮膚疾患、並びに尋常性類天疱瘡および水疱性類天疱瘡を含む自己免疫水疱形成疾患を患う患者において、プロテアーゼレベルを減少させるのにも有用である可能性がある。皮膚障害を治療するため、注入によって、エアロゾルを介して、サイピン組成物を全身投与することが可能であるし、または局所注入を介して局所投与することが可能であるし、あるいは、罹患領域にローション、軟膏、クリーム、またはゲル中で直接適用することが可能である。

【0157】

さらに、本発明のサイピン・ポリペプチド、断片、変異体、アンタゴニスト、アゴニスト、抗体、および結合パートナーは、限定されるわけではないが、以下の群のものを含む、1以上の医学的状態および疾患を予防し、治療しそして/または診断するのに潜在的に有用である: 乾癬; 湿疹; 染色体18qの破壊点または欠失を伴う癌; 肺、頸管および食道の癌腫を含む扁平上皮癌; 変形性関節炎および慢性関節リウマチを含む関節炎関節における細胞外マトリックス破壊または病変形成を伴う関節炎; 肝硬変; 血栓症; 肺気腫; 血管性浮腫(angioedema); 腫瘍増殖; 血管止血に関与する障害; 補体活性化を伴う障害; 腫瘍浸潤および転移などの細胞外マトリックスの異常な分解に関連する障害; 消化に関与する障害; 線維素溶解の調節に関与する障害; 凝血カスケードの障害; 炎症および高血圧における血管拡張に関連する障害。

【0158】

使用する療法分子または分子類は、治療しようとする異常の病因および関与する生物学的経路に応じるであろうし、そしてサイピン・ポリペプチドの変異体、断片、および結合パートナーは、サイピン・ポリペプチドと類似の影響または異なる影響を有する可能性がある。サイピン・レベルまたは活性を操作するのに有用な分子は、本発明の全長サイピン・ポリペプチドまたはその断片、アリル変異体、突然変異タンパク質(muttein)、アンタゴニスト、アゴニスト、抗体、および結合パートナーを含むことが可能であり、そして本明細書に記載する生物学的および療法的考慮にしたがって、個々の当業者により、本発明の態様として提供されるものから、特定の分子または分子類を選択することが可能であると理解される。

【0159】

サイピン・ポリペプチドおよびそのアンタゴニストの投与

本発明は、医学的障害、そして特に上述の障害などのサイピン仲介障害を患う患者、好ましくは哺乳動物患者、そして最も好ましくはヒト患者を治療するための化合物、組成物、および方法を提供する。こうしたサイピン仲介障害には、サイピンおよびその結合パートナー間の結合によって(直接または間接的に)引き起こされるかまたは悪化される状態が含まれる。本開示の目的のため、用語「疾病」、「疾患」、「医学的状態」、「異常な状態」等は、用語「医学的障害」と交換可能に用いられる。用語「治療する(treat)」、「治療すること(treating)」および「治療(treatment)」には、本明細書において、治療的、防御的(例えば予防的)および対症的または寛解的治療が含まれる。こうした療法的使用のため、サイピン・ポリペプチドおよび断片、サイピン・ポリペプチドをコードするサイピン核酸、並びに/あるいは抗体などのサイピン・ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、公知の手段を通じて、必要な患者に投与することが可能である。本発明の組成物は、天然ポリペプチド、変異体、誘導体、オリゴマー、および生物学的活性断片などの、本明細書に記載するいかなる型のポリペプチドを含

【0160】

療法的に有効な量。本発明の治療法または使用法を実施する際、本発明の療法剤の療法的有効量を、好ましくはサイピン・ポリペプチドの活性に関連する疾患を治療するかまたは寛解するため、治療しようとする状態を有する被験者に投与する。「療法剤」には、限定なしに、本明細書に記載するサイピン・ポリペプチド、断片、および変異体; サイピン・

ポリペプチド、断片、および変異体をコードする核酸；サイピンに特異的なアゴニスト性またはアンタゴニスト性抗体などのサイピン・ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト；サイピン・ポリペプチド結合パートナー；並びにサイピン・ポリペプチド、断片、変異体、および結合パートナーで形成される複合体などのいずれかが含まれる。本明細書において、用語「療法的有効量」は、意味がある患者の利益、すなわち相当する医学的状态の治療、治癒、予防または寛解、あるいはこうした状態の治療、治癒、予防または寛解率の増加を示すのに十分な薬剤組成物または方法の各療法剤または他の活性構成要素の総量を意味する。本明細書に提供する療法剤は、他の療法剤と組み合わせて、連続して、交互に、または同時に投与することが可能である。

【0161】

本明細書において、句、療法剤の「療法的有効量を投与する」は、障害の重症度を反映する、少なくとも1つの示標において、改善、そして好ましくは持続した改善を誘導するのに十分な量および時間、前記療法剤で患者を治療することを意味する。改善は、患者が、1日以上、またはより好ましくは1週間以上離れた、少なくとも2回の機会に改善を示したならば、「持続した」とみなされる。改善の度合いは、表明または症状に基づいて決定され、そして決定はまた、生活の質 (quality-of-life) アンケートなどの、患者に実施されるアンケートを使用することも可能である。患者の疾病の度合いを反映する多様な示標は、治療の量および期間が十分であるかどうか決定するため、評価することが可能である。選択された単数または複数の示標に関するベースライン値は、療法剤の最初の用量の投与前に、患者を検査することによって、確立する。好ましくは、ベースライン検査は、最初の用量投与の約60日以内に行う。急性症状を治療するために療法剤が投与される場合、最初の用量は、傷害が生じた後、現実的にできるだけ速やかに投与する。患者が、選択された単数または複数の示標のベースラインを越える改善を明示するまで、サイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストなどの療法剤を投与することによって、改善を誘導する。慢性状態を治療する際、改善のこの度合いは、少なくとも1ヶ月以上、例えば、1、2、もしくは3ヶ月またはそれ以上の期間、あるいは無期限に、この医薬品を反復投与することによって、得られる。1～6週間の期間、または単回用量であっても、しばしば、急性状態または傷害を治療するのに十分である。治療後の患者の疾病の度合いが、1以上の示標にしたがって、改善されているように見えたとしても、同一レベル、あるいは減少した用量または頻度で、無期限に治療を続けてもよい。ひとたび治療を減少させるかまたは中断したら、後に、症状が再出現した場合、元来のレベルで再開してもよい。

【0162】

投薬量決定。当業者は、適切な投薬量は、治療しようとする障害の性質および重症度、患者の体重、年齢、全身状態、および以前の疾病および/または治療、並びに投与経路などの要因に応じて、多様であろうことを認識するであろう。予備的用量は、動物試験にしたがって決定することが可能であり、そしてヒト投与の投薬量決定は、標準的投薬量決定試験などの、当該技術分野に認められた慣例にしたがって行う。例えば、療法的有効用量は、最初に、細胞培養アッセイから概算することが可能である。投薬量は、化合物の比活性に応じるであろうし、そして日常的な実験によって、容易に決定可能である。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養で決定されるようなIC₅₀ (すなわち症状の最大障害の半分を達成する試験化合物の濃度) を含みつつ、毒性を最小限にする、循環血漿濃度範囲を達成するよう、処方することが可能である。こうした情報を用いて、ヒトにおいて、有用な用量を、より正確に決定することが可能である。最終的には、主治医が、個々の患者各々を治療する、本発明の療法剤の量を決定するだろうし、そして個々の患者が必要とするのに応じて、投与用量および頻度を変調することが可能である。

【0163】

サイピンまたはその断片、サイピン・アンタゴニストであるタンパク質またはサイピン・アゴニストであるタンパク質を含んでなる薬剤組成物は、kg体重あたり、約0.01 ng～約100 mg (好ましくは約0.1 ng～約10 mg、より好ましくは約0.1マイ

10

20

30

40

50

クログラム～約1mg)のポリペプチドを含有すべきである。本発明の1つの態様において、本明細書に開示する多様な医学的障害を治療するため、こうした組成物を週1回投与し、別の態様において、少なくとも週2回投与し、そして別の態様において、少なくとも週3回投与する。注射する場合、成人用量あたり、有効量のサイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストは体表面積に基づいて計算可能であり、そして $1 \sim 20 \text{ mg/m}^2$ の用量を含むことが可能であり、そして好ましくは $5 \sim 12 \text{ mg/m}^2$ を含む。あるいは、均一用量を投与してもよく、その量は、 $5 \sim 100 \text{ mg}$ /用量の範囲であってもよい。皮下注射によって投与される均一用量の典型的な用量範囲は、 $5 \sim 25 \text{ mg}$ /用量、 $25 \sim 50 \text{ mg}$ /用量および $50 \sim 100 \text{ mg}$ /用量である。本発明の1つの態様において、1、5、10、25または50mgを含有する均一用量で、サイピン・ポリペプチドを含有する注射に許容しうる調製を投与することによって、医学的障害を治療する。1、5、10、25または50mg用量は、特に慢性状態に対して、反復投与することが可能である。注射以外の投与経路を用いるならば、用量は、標準的な医学的実施にしたがって、適切に調節する。

10

20

30

40

50

【0164】

投与頻度および治療期間は多様である可能性がある。多くの場合、患者状態の改善は、少なくとも3週間の期間に渡って、週1～3回、あるいは少なくとも3週間、週1または2回、療法的用量のサイピン・ポリペプチドまたはサイピン・アンタゴニストを注射することによって得られるであろうが、所望の度合いの改善を誘導するのに、より長い期間の治療が必要である可能性がある。不治の慢性状態では、措置は、患者の医師によって、こうしたものが必要だと思われたならば、用量および頻度に調整を行ったうえ、無期限に続けてもよい。前述の用量は、18歳以上の年齢のヒトである、成体患者に関する例である。

【0165】

小児科患者(年齢4～17歳)に関しては、1つの適切な措置は、週あたり1回以上の皮下注射によって投与される、最大用量25mgまでのサイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストの 0.4 mg/kg の皮下注射を伴う。サイピン・ポリペプチドに対する抗体を、サイピン・ポリペプチドアンタゴニストとして用いる場合、好ましい用量範囲は、 $0.1 \sim 20 \text{ mg/kg}$ 、そしてより好ましくは $1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ である。抗サイピン抗体の別の好ましい用量範囲は、 $0.75 \sim 7.5 \text{ mg/kg}$ である。ヒト化抗体、すなわち、抗体分子の抗原結合部分が非ヒト供給源由来である抗体が好ましい。こうした抗体は、静脈内注射または投与することが可能である。

【0166】

処方。本発明のサイピン・ポリペプチド(限定なしに組換えおよび非組換え供給源を含む、いかなる供給源由来でもよいもの)の有効量を、生理学的に許容しうる希釈剤、キャリアー、または賦形剤などの他の構成要素と組み合わせて含んでなる組成物を、本明細書に提供する。用語「薬学的に許容しうる」は、活性成分(類)の生物学的活性の有効性に干渉しない非毒性成分を意味する。投与に適した処方には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および処方をレシピエントの血液と等張にする溶質を含有してもよい水性および非水性無菌注射溶液;並びに懸濁剤または粘稠化剤を含んでもよい水性および非水性無菌懸濁物が含まれる。ポリペプチドは、薬学的に有用な組成物を調製するのに用いられる既知の方法にしたがって、処方可能である。これらは、単一の活性成分として、または既定の徴候に適した他の既知の活性成分と共に、薬学的に許容しうる希釈剤(例えば、生理食塩水、 Tris-HCl 、酢酸、およびリン酸緩衝溶液)、保存剤(例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン類)、乳化剤、可溶化剤、アジュバントおよび/またはキャリアーと混合して組み合わせてもよい。薬剤組成物に適した処方には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, 1980, Mack Publishing Company, ペンシルバニア州イーストンに記載されるものが含まれる。さらに、薬剤組成物用のサイピンは、ポリエチレングリコール(PEG)、金属イオンと複合体化しているか、またはポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル類、デキストラン等のポリマー化合物に取り込まれているか、またはリポソーム、

マイクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層小胞、赤血球ゴーストもしくはスフェロプラストに取り込まれていてもよい。リポソーム処方に適した脂質には、限定なしに、モノグリセリド類、ジグリセリド類、スルファチド類、リゾレシチン、リン脂質類、サポニン、胆汁酸類等が含まれる。こうしたリポソーム処方の調製は、例えば、米国特許第4,235,871号；米国特許第4,501,728号；米国特許第4,837,028号；および米国特許第4,737,323号に開示されるように、当該技術分野の技術レベルの範囲内である。こうした組成物は、物理的状态、可溶性、安定性、*in vivo*放出速度、または*in vivo*クリアランス速度に影響を与えるであろうし、そしてしたがって、意図される適用にしたがって選択され、そのため、キャリアーの特性は、選択された投与経路に応じるであろう。本発明の1つの好ましい態様において、サイピン・ポリペプチドの持続放出型を用いる。開示する方法で使用するのに適した持続放出型には、限定されるわけではないが、緩慢溶解生体適合性ポリマー（米国特許第6,036,978号に記載されるアルギン酸微小粒子など）に被包されたサイピン・ポリペプチド、このようなポリマー（局所適用ヒドロゲル類を含む）と混合されたもの、および/または生体適合性半透性移植体中に入れられたものが含まれる。

10

20

30

40

50

【0167】

療法化合物の組み合わせ。本発明は、サイピン・ポリペプチド、アンタゴニストまたはアゴニストと組み合わせる同一患者に投与する1以上の他の薬剤と同時の、サイピン・ポリペプチド、サイピン・アンタゴニストまたはサイピン・アゴニストの投与をさらに提供し、各薬剤は、その医薬品に適した措置にしたがって投与する。一般的に、さらなる薬剤は、そのためにサイピンを投与するのと同じ医学的状態に対して有効なものである。「同時投与」は、組み合わせた構成要素での同時または連続治療と共に、薬剤を交互に投与する措置、または一方の構成要素を長期に投与し、そして単数または複数の他方のものを断続して投与する措置を含む。構成要素は、同一または別個の組成物中で、そして同一または異なる投与経路によって投与してもよい。薬剤組成物はさらに、サイピン・ポリペプチドの活性を増進するか、あるいは治療においてその活性または使用を補足する（*complement*）他の剤を含有することが可能である。こうしたさらなる因子および/または剤を薬剤組成物中に含んで、本発明のポリペプチドとの相乗効果を生じるか、または副作用を最小限にすることが可能である。逆に、本発明のサイピン・ポリペプチド、アンタゴニストまたはアゴニストは、サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、他の造血因子、血栓溶解因子または抗血栓因子、または抗炎症剤の副作用を最小限にするため、特定のサイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、他の造血因子、血栓溶解因子または抗血栓因子、または抗炎症剤の処方中に含まれることが可能である。同時に投与すべき薬剤のさらなる例には、限定されるわけではないが、鎮痛剤、コルチコステロイド、炎症性サイトカインのアンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症剤、ペントキシフィリン、サリドマイド、並びにアザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ヒドロキシクロロキン硫酸、メトトレキセート、レフルノミド、ミノサイクリン、ペニシラミン、スルファサラジン、および経口金、金チオリンゴ酸ナトリウム、および金チオグルコースなどの金化合物などの疾患修飾抗リウマチ薬剤（DMARD）が含まれる。さらに、サイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストは、サイピン・ポリペプチドに対する抗体、または天然サイピン・ポリペプチドの競合的阻害剤として作用するサイピン・ポリペプチド由来ペプチドを含む、第二のサイピン・ポリペプチド/アンタゴニストと組み合わせることが可能である。

【0168】

投与経路。いかなる有効な投与経路を用いて、核酸を含んでなる組成物を含む、サイピン・ポリペプチドまたはそのアンタゴニストを、療法的に投与してもよい。非経口投与には、例えば、多量（*bolus*）注射によるか、または連続注入による、関節内、静脈内、筋内、病巣内、腹腔内または皮下経路を介した、注射が含まれ、そしてまた、例えば疾患または傷害部位での局所投与も含まれる。投与の他の適切な手段には、移植体からの持続放出；エアロゾル吸入および/またはガス注入；点眼剤；膣または直腸座薬；頬側調製；

丸剤（ピル）、シロップ、ロゼンジまたはチューインガムを含む経口調製；およびローション、ゲル、スプレー、軟膏または他の適切な技術などの局所調製が含まれる。あるいは、ポリペプチドを発現する培養細胞を移植することによって、例えばサイピン・ポリペプチドまたはタンパク質性アンタゴニストを発現する細胞を移植することによって、サイピン・ポリペプチド、アンタゴニストまたはアゴニストを投与することが可能である。細胞はまた、増殖を変調するため、またはこうした細胞で所望の効果または活性を生じるため、サイピン・ポリペプチドの存在下で、*ex vivo*で培養することも可能である。その後、処理した細胞を、療法目的のため、*in vivo*で導入することが可能である。

【0169】

別の態様において、サイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストをコードするDNAでの、*in vivo*または*ex vivo*のトランスフェクションによって、患者自身の細胞が、サイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストを産生するよう、誘導する。このDNAは、例えば、サイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストをコードする裸のDNAまたはリボソーム被包DNAを注入することによって、あるいはトランスフェクションの他の手段によって、患者の細胞に導入することが可能である。本発明の核酸はまた、細胞または生物への核酸の導入のための他の既知の方法（限定なしに、ウイルスベクターまたは裸のDNAの形でものが含まれる）によっても、患者に投与することが可能である。サイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニストを、1以上の他の生物学的に活性である化合物と組み合わせて投与する際、これらは、同一のまたは異なる投与によって投与可能であり、そして同時に、別個に、または連続して投与可能である。

【0170】

経口投与。本発明の療法剤の療法的有効量を経口投与する際、本発明のポリペプチドは、錠剤、カプセル、粉末、溶液またはエリキシル剤の形であろう。錠剤型で投与する際、本発明の薬剤組成物は、さらに、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体キャリアーを含有してもよい。錠剤、カプセル、および粉末は、本発明のポリペプチドを約5～95%、そして好ましくは本発明のポリペプチドを約25～90%含有する。液体型で投与する際、水、エタノール、石油、ピーナツ油、ミネラルオイル、ダイズ油、またはゴマ油などの動物または植物起源の油、あるいは合成油などの液体キャリアーを添加してもよい。薬剤組成物の液体型はさらに、生理学的生理食塩溶液、デキストロースまたは他の糖類溶液、あるいはエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコール類を含有してもよい。液体型で投与する際、薬剤組成物は、本発明のポリペプチドを、重量約0.5～90%、そして好ましくは、本発明のポリペプチドを、約1～50%含有する。

【0171】

注射による投与。ポリペプチドを含んでなる療法剤の場合、注射が好ましい投与経路の1つである。本発明のポリペプチドの療法的有効量を、静脈内、皮膚または皮下注射によって投与する際、本発明のポリペプチドは、発熱物質不含で非経口的に許容しうる水性溶液の形であろう。pH、等張性、安定性等を十分考慮した、こうした非経口的に許容しうるポリペプチド溶液の調製は、当該技術分野の範囲内である。静脈内、皮膚、または皮下注射のための好ましい薬剤組成物は、本発明のポリペプチドに加え、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、デキストロース注射剤、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射剤、乳酸リンゲル注射剤、または当該技術分野に知られるような他のビヒクルを含有すべきである。本発明の薬剤組成物はまた、当業者に知られる、安定化剤、保存剤、緩衝剤、酸化防止剤、または他の添加物も含有してもよい。本発明の薬剤組成物を用いた静脈内療法の期間は、治療する疾患の重症度、並びに個々の患者各々の状態および潜在的な特異体質反応に応じて、多様であろう。本発明のポリペプチドの各適用期間は、連続静脈内投与12～24時間の範囲内であろうと意図される。最終的には、主治医が、本発明の薬剤組成物を用いた静脈内療法の適切な期間に関して、決定するであろう。

【0172】

骨および組織投与。骨、軟骨、腱または靭帯障害を治療するのに有用な本発明の組成物に

関しては、療法は、局所的に、全身性に、あるいは移植物または装置として局所的に、組成物を投与することを含む。投与する際、本発明に使用するための療法組成物は、もちろん、発熱物質不含で、生理学的に許容しうる型である。さらに、組成物は、望ましくは、骨、軟骨または組織損傷部位に搬送するため、粘稠性型で被包または注射してもよい。創傷治癒および組織修復には、局所投与が適している可能性がある。所望により、上述のような組成物中に含まれていてもよい、本発明のポリペプチド以外の療法的に有効な剤が、本発明の方法において、組成物と同時にまたは連続して、代わりにまたはさらに投与されてもよい。好ましくは、骨および/または軟骨形成のため、組成物は、骨および/または軟骨損傷部位に、ポリペプチド含有組成物を搬送し、発展する骨および軟骨のための構造を提供することが可能であり、そして最適には、体に吸収されることが可能であるマトリックスを含むであろう。こうしたマトリックスは、他の移植医学的適用のため、現在用いられる素材で形成されることが可能である。マトリックス素材の選択は、生体適合性、生物分解性、機械的特性、美容的外見および界面特性に基づく。組成物の特定の適用が適切な処方方を明確にするであろう。組成物のための潜在的なマトリックスは、生物分解性でそして化学的に定義される、硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびポリ無水物であることが可能である。他の潜在的な素材は、骨または真皮コラーゲンなどの生物分解性で生物学的によく定義されるものである。さらなるマトリックスは、純粋ポリペプチドまたは細胞外マトリックス構成要素で構成される。他の潜在的なマトリックスは、焼結ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミン酸塩、または他のセラミックスなどの、非生物分解性でそして化学的に定義されるものである。マトリックスは、ポリ乳酸およびヒドロキシアパタイトまたはコラーゲンおよびリン酸三カルシウムなど、上述の種類の素材のいずれかの組み合わせで構成されてもよい。バイオセラミックスは、カルシウム - アルミン酸 - リン酸におけるように、組成物が改変されていてもよく、そしてプロセッシングして、孔サイズ、粒子サイズ、粒子形状、および生物分解性などの組成が改変されていてもよい。現在好ましいのは、150 ~ 800ミクロンの範囲の直径を有する多孔粒子の形の、乳酸およびグリコール酸の50 : 50 (モル重量) コポリマーである。いくつかの適用において、カルボキシメチルセルロースまたは自己血餅などの隔絶剤 (sequestering agent) を利用して、ポリペプチド組成物がマトリックスから解離するのを防止することが有用であろう。隔絶剤の好ましいファミリーは、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピル - メチルセルロース、およびカルボキシメチル - セルロースを含む、アルキルセルロース (ヒドロキシアルキルセルロースを含む) などのセルロース性素材であり、最も好ましいのは、カルボキシメチルセルロース (CMC) の陽イオン塩である。他の好ましい隔絶剤には、ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ (エチレングリコール)、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ (ビニルアルコール) が含まれる。本明細書において有用な隔絶剤の量は、総処方重量に基づいて、0.5 ~ 20重量%、好ましくは1 ~ 10重量%であり、これは、ポリマーマトリックスからのポリペプチドの脱離を防止し、そして組成物の適切な取り扱いを提供するのに必要な量であり、それでもなお前駆細胞がマトリックスに浸潤するのを防止するほど多くなく、それによってポリペプチドが前駆細胞の骨形成活性を補助する機会を提供する量に相当する。

10

20

30

40

【0173】

さらなる組成物において、本発明のポリペプチドは、骨および/または軟骨欠損、創傷または問題の組織の治療に有益な他の剤と組み合わせることが可能である。これらの剤には、上皮増殖因子 (EGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF - アルファおよび TGF - ベータ)、およびインスリン様増殖因子 (IGF) などの多様な増殖因子が含まれる。組織再生に使用すべきポリペプチド含有薬剤組成物の投薬措置は、ポリペプチドの作用を修飾する多様な要因、例えば形成されるのが望ましい組織重量、損傷部位、損傷組織の状態、創傷サイズ、損傷組織の種類 (例えば骨)、患者の年齢、性別、および食餌、感染の重症度、投与時間および他の臨床的要因を考慮し

50

て、主治医によって決定されるであろう。投薬量は、再構成に用いたマトリックスの種類、および薬剤組成物中の他のポリペプチドの包含に応じて、多様である可能性がある。例えば、IGF I（インスリン様増殖因子I）などの他の既知の増殖因子を最終組成に添加してもまた、投薬量が達成される可能性がある。経過は、組織/骨増殖および/または修復の定期的な評価、例えばX線、組織形態計測的測定およびテトラサイクリン標識によって、監視することが可能である。

【0174】

獣医学的使用。ヒト患者に加え、サイピン・ポリペプチドおよびアンタゴニストは、ペット（イヌ、ネコ、鳥、霊長類等）、飼育農場動物（ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、鳥類等）などの、非ヒト動物または異常なサイピン発現を伴う状態を患う動物いずれかの疾患状態の治療に有用である。こうした例では、適切な用量は、動物の体重にしたがって決定可能である。例えば、 $0.2 \sim 1 \text{ mg/kg}$ の用量が使用可能である。あるいは、用量は、動物の表面面積にしたがって決定され、典型的な用量は、 $0.1 \sim 20 \text{ mg/m}^2$ 、またはより好ましくは $5 \sim 12 \text{ mg/m}^2$ の範囲である。イヌまたはネコなどの小動物に関しては、適切な用量は 0.4 mg/kg である。好ましい態様において、サイピン・ポリペプチドまたはアンタゴニスト（好ましくは患者と同じ種由来の遺伝子で構築される）は、動物の状態が改善されるまで、週1回以上、注射または他の適切な経路によって投与するか、あるいは無期限に投与可能である。

10

【0175】

医薬品製造。本発明はまた、本明細書に開示する医学的障害の予防または療法的治療のための医薬品製造における、サイピン・ポリペプチド、断片、および変異体；サイピン・ポリペプチド、断片、および変異体をコードする核酸；抗体などのサイピン・ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト；サイピン・ポリペプチド結合パートナー；サイピン・ポリペプチド、断片、変異体、および結合パートナーで形成される複合体等の使用にも関する。

20

【0176】

本明細書に開示するサイピン配列の天然存在ゲノム変異体として、サイピン・ポリペプチドの変異を提供する；こうした変異は、個々にまたはいかなる組み合わせで、あるいは上述のような選択的スプライシング変異と組み合わせで、サイピン・ポリペプチドまたは核酸に取り込むことも可能である。

30

【0177】

以下の実施例は、特定の態様を例示することを意図し、そして本発明の範囲を限定することを意図しない。

【実施例】

【0178】

（実施例1）

ヒト・セルピン・ファミリー新規メンバーの同定

以下に記載するように、新規セルピン遺伝子を同定し、そして配列決定した。この新たに発見されたタンパク質をコードするヌクレオチド配列を配列番号1に示す。この新規セルピン遺伝子は、主に上皮組織で発現されているようである（以下の実施例2を参照されたい）ため、「サイピン」と名づけた。

40

【0179】

サイピンは以下のように発見された。ヒトゲノムにコードされると予測されるアミノ酸配列の列挙を含むデータセットをCelera Genomics（メリーランド州ロックビル）から受け取った。このデータセットをBLASTアルゴリズムで検索して、セルピン・ファミリーポリペプチドを同定した。R22ゲノムコンティグ51804590に位置するIMX96867は、新規セルピン遺伝子のエクソン1であると認識された。2つの他のセルピン遺伝子断片、IMX96869およびIMX96874が、同じ新規セルピン遺伝子のエクソン3および6を含有することを見出した。これらの3つのエクソンがR22ゲノムコンティグ51804590上で隣接することを見出した。SCCA-2

50

cDNA配列を用いた電子ゲノムウォーキングによって、この同一コンティグ上で、3つの他の隣接サイピン・エクソン(エクソン4、5および7)を同定した。胸腺cDNAを配列決定することによって、エクソン2を発見した。R22ゲノムコンティグ51804590上、エクソン1および3の間に位置することを決定して、エクソン2であることを確認した。

【0180】

胸腺cDNAをテンプレートとして用いて、逆転写酵素-PCRクローニングおよび配列決定によって、この新規サイピンの完全コード配列を決定した。この試みでは、サイピンの5'および3'非翻訳領域に対して設計した以下のオリゴヌクレオチドを使用した：

配列番号3：5' TGGTTT TAGATCGTTATAAGTTT TAC 3' 10

配列番号4：5' CTC CAGCTCCAAAGTACTAGACACTGCTCC 3'

上述の2つのオリゴヌクレオチドは、ヒト胸腺由来の転写物に対応するcDNAを増幅するPCRプライマーとして用いた。以下に示す入れ子プライマーを用いた、別の周期のPCRを用いて、開始メチオニンから終結コドンまでのサイピンcDNAを増幅した。これらの入れ子プライマーは以下の配列を有した：

配列番号5：5' ATACTAGTAGTATGGACTCTCTTGT TACAGC A A A C A C C 3' 20

配列番号6：5' TAGCGGCCCGCTTAAGGAGAGCAGACCCCTGCC ATAAAGAG 3'

以下のさらなるPCRプライマーもまた用いて、サイピンのエクソン1、2および3をコードするcDNAを生成した：

配列番号7：5' ATGGACTCTCTTGT TACAGC 3'

配列番号8：5' CTCCTCCATAAAGCCTGT TGG 3'

PCR研究から得た配列は、最初にR22ゲノムコンティグ51804590で同定されたサイピン・エクソン配列を確認した。エクソン2は、エクソン1およびエクソン3に渡るPCR産物中に同定された。

【0181】

サイピンの遺伝子構造は、配列番号1に示すcDNA配列とR22ゲノムコンティグ51804590を比較することによって決定した。サイピン遺伝子はまた、ゲノムコンティグGenBank寄託番号AC015536にも存在することが見出された。AC015536コンティグにおいて、サイピン・コード配列を含有するエクソンのおおよその位置を以下の表1に示すと共に、配列番号1において、これらのヌクレオチドの対応する位置を示す。表1はまた、どのアミノ酸が7つのサイピン・エクソン各々にコードされるかも示す。 30

【0182】

表1

【0183】

【表1】

エクソン	AC015536 ヌクレオチド	配列番号 1 ヌクレオチド	スプライシング部位	ヌクレオチド	AA
1	154946-154779	1-168	3'	168	56
2	152744-152610	169-303	5', 3'	135	45
3	151497-151357	304-444	5', 3'	141	47
4	149980-149862	445-562	5', 3'	118	39.33
5	147080-146935	563-705	5', 3'	143	47.67
6	145597-145430	706-873	5', 3'	168	56
7	144431-144026	874-1278	5'	405	134

10

【 0 1 8 4 】

サイピン遺伝子のコード領域には、AC015536 コンティグ上、およそ 10,900 ヌクレオチドの距離に渡る、7つのエクソンおよび6つのイントロンが含まれる。サイピンの完全オープンリーディングフレームは、1275ヌクレオチドからなり、そして425アミノ酸を含有するタンパク質をコードする(配列番号1および2)。各イントロンは、その5'および3'境界でコンセンサススプライシング部位を有する。サイピン遺伝子の5'および3'非翻訳領域が、表1に示すような5'および3'端に対応する部分を越えて、コンティグ配列に沿ってさらに伸長可能である可能性がある。

20

【 0 1 8 5 】

サイピンのアミノ酸配列(配列番号2)を他のセルピン・ファミリーメンバーのアミノ酸配列と比較した。アミノ酸類似性スコアリングマトリックス = b l o s u m 6 2、ギャップ生成ペナルティ = 8、およびギャップ伸長ペナルティ = 2で、GCG「プリティ」多数配列並列プログラムを用いて、並列を行った。サイピンと最も近く関連するいくつかのセルピンは、LEI(配列番号9)、PAI2(配列番号10)、SERPINB10(配列番号11)、SCCA-1(配列番号12)、SCCA-2(配列番号13)、およびプロスタピン(配列番号14)であった。表2のLEI、PAI2、SERPINB10、SCCA-1、SCCA-2およびプロスタピン配列の供給源は、それぞれ: S w i s s P r o t 第 P 3 0 7 4 0 号; G e n B a n k 第 X P _ 0 0 8 7 4 6 号; G e n B a n k 第 N P _ 0 0 5 0 1 5 号; S w i s s P r o t 第 P 2 9 5 0 8 号; S w i s s P r o t 第 P 4 8 5 9 4 号; および G e n e S e q 第 Y 1 5 1 5 6 号であった。表2において、並列を容易にするため、提示する並列から配列番号14のアミノ酸207~430のプロスタピン挿入を省いた。表2は、並列中の少なくとも5つのアミノ酸配列間で同一であるコンセンサス残基を含む。表2の大文字の残基は、コンセンサス残基とマッチするものである。表2のアミノ酸残基の番号付けは、サイピン・アミノ酸配列(配列番号2)のこれらの残基の位置に対応する。

30

40

【 0 1 8 6 】

表 2

【 0 1 8 7 】

【 表 2 a 】

10

20

30

40

【 0 1 8 8 】
【 表 2 b 】

LEI (9)e evHsrFqsLn adiNkrgasY iLklANrLyG EKtynFlpEf
PAI2 (10)	.ailqaqaad kiHssFrsLs saiNastgnY lLesvNkLfG EKsasFreEY
SERPBI0(11)	.mefnlSnse eiHsdFqtLi seilkpnddY lLktANaiyG EKTYaFhnkY
SCCA-1 (12)sg nvHhqFqkLl tefNkstdaY eLkiANKLfG EKTYlFlqEY
SCCA-2 (13)sg nvHhqFqkLl tefNkstdaY eLkiANKLfG EKTYqFlqEY
サイピン (2)	qagslnnesg lvscYFgqLl skldriktdY tLsiANrLyG EgefPicqEY
Prstpn (14)qag riHseFgvxf sqiNqpsnc tLsiANrLyG tKTmaFhqQY
コンセンサス	■ ■ ■ ■ ■ --- --H--F--L- ---N-----Y -L--AN-L-G EKT--F--EY
	151 200
LEI (9)	LvstqKtYga dlasVDFqha sEdaRKtINg WVkgQTeGKI peLlasgmvd
PAI2 (10)	irlcqKyYss epqaVDFlec aEeaRKkINs WVktQTkGKI pNLlpegsvd
SERPBI0(11)	Ledmktyfga epqpVnFvea sdqiRKdINs WVerQTeGKI qNLlpddsvd
SCCA-1 (12)	LdaikKfYqt svesVDFana pEesRKkINs WVEsQTneKI kNLipegnig
SCCA-2 (13)	LdaikKfYqt svestDFana pEesRKkINs WVEsQTneKI kNLfpdgtig
サイピン (2)	LdgviqfYht tiesVDFqkn pEksRqeINf WVEcQsqGKI keLfskdain
Prstpn (14)	LscseKwYqa rlqtVDFeqs tEetRKtINa WVenkTnGKv aNLfgkstid
コンセンサス	L----K-Y-- ----VDF--- -E--RK-IN- WVE-QT-GKI -NL-----
	201 248
LEI (9)	nmTklVLVNA iYFKGnWkdk FmkeaTtnaP FrlNkkdrK. .tVkMMYQkk
PAI2 (10)	gdTrmVLVNA vYFKGkWktp FekklnglyP FrvNsaqrt. .pVqMMylre
SERPBI0(11)	stTrmiLVNA lYFKGiWehq FlvqnTtekP FriNettsK. .pVqMMfmkk
SCCA-1 (12)	snTtlVLVNA iYFKGqWekk FnkedTkeek FwpNkntyK. .sigMMrQyt
SCCA-2 (13)	ndTtlVLVNA iYFKGqWenk FkkenTkeek FwpNkntyK. .sVqMMrQyn
サイピン (2)	aeTvlVLVNA vYFKakWety FdhenTvdaP FclNanenK. .sVkMMtQkg
Prstpn (14)	pssvmVLVNA iYFKGqWqnk FqvreTvksP FqlseΔqgKn vtVeMMYQig
コンセンサス	--T--VLVNA -YFKG-W--- F----T---P F--N----K- --V-MM-Q--
	249 297
LEI (9)	kfaygyiEdl kcrvLElPY. qGeelSMviL LPddiedest GLkkiEeqLT
PAI2 (10)	klnigyEdl kAqiLElPY. aG.dvSMflL LPdeiadvst GLelleEseiT
SERPBI0(11)	klhifhiEkp kAvgLqlyY. ksrdLSlilL LPedi....n GLeqLEkaiT
SCCA-1 (12)	sfhfaseLdv qAkvLEiPY. kGkdLSMivL LP....neid GLqkLEekLT
SCCA-2 (13)	sfnfalleDv qAkvLEiPY. kGkdLSMivL LP....neid GLqkLEekLT

10

20

30

40

【 0 1 8 9 】

【 表 2 c 】

サイピン (2)	lyrigfiEev kAqiLEmrYt kGk.LSMfvL LPshskdnlk GLeeLErkiT
Prstpn (14)	tfklafvkep qmqvLElPYv nnk.LSMiil LPvgian... .LkqiEkqln
コンセンサス	-----E-- -A--LE-PY- -G--LSM--L LP----- GL--LE---T
	298 347
LEI (9)	lEKLhEWtkp eNldfieVnv sLPRFKLEeS YtLnSdLarl GvqDlFNssk
PAI2 (10)	ydKLnkWTSk dkMaEdeVev yiPqFKLEeh YeLrSiLrsM GmeDaFNkgr
SERP10(11)	yEKLnEWTSa dmMelyeVql hLPkFKLEdS YdLkStLssM GmsDaFsqsks
SCCA-1 (12)	aEKLmEWTS1 qNMrEtrVdl hLPRFKvEeS YdLkdtLrtM GmvDiFNgd.
SCCA-2 (13)	aEKLmEWTS1 qNMrEtcVdl hLPRFKmEeS YdLkdtLrtM GmvniFNgd.
サイピン (2)	yEKmvaWsSs eNMsEesVvl sfPRFtLEdS YdLnSiLqdM GitDiFdetr
Prstpn (14)	sgtfhEWTSs sNMmEreVev hLPRFKLEtk YeLnSlLksl GvtDlFNqvk
コンセンサス	-EKL-EWTS- -NM-E--V-- -LPRFKLE-S Y-L-S-L--M G--D-FN---
	348 396
LEI (9)	ADLSGMSgar difiSkivHK sFVEVnEEGT EAAAATagia tfCmlmp.ee
PAI2 (10)	AnfSGMSern dLflSevfHq amVdVnEEGT EAAAgtggvm tgRtghg.gp
SERP10(11)	ADfSGMSsar nLflSnvfHK aFVEinEqGT EAAAgsgei dirirvp.si
SCCA-1 (12)	ADLSGmtgsr gLvLSgvlHK aFVEVtEEGa EAAAAtavvg fgSspastne
SCCA-2 (13)	ADLSGmtwsh gLsvSkvlHK aFVEVtEEGv EAAAAtavvv velSspstne
サイピン (2)	ADLtGiSpss nLyLSkiiHK tFVEVdEnGT qAAAAtgavv seRslrsw.v
Prstpn (14)	ADLSGMSptk gLyLSkaiHK syldVsEEGT EAAAAtgdsi avkslp.mra
コンセンサス	ADLSGMS--- -L-LS---HK -FVEV-EEGT EAAAAAT---- -
	397 425
LEI (9)	nFtAdHPFLF FIRHNssgsI LFfGRfsSP
PAI2 (10)	qFvAdHPFLF lImHkiTNcI LFfGRfsSP
SERP10(11)	eFnANHPFLF FIRHNkTNtI LFyGRlcSP
SCCA-1 (12)	eFhcNHPFLF FIRqNkTNsI LFyGRfsSP
SCCA-2 (13)	eFccNHPFLF FIRqNkTNsI LFyGRfsSP
サイピン (2)	eFnANHPFLF FIRHNkTqtI LFyGRvcSP
Prstpn (14)	qFkANHPFLF FIRHthTNtI LFcGklaSP
コンセンサス	-F-ANHPFLF FIRHN-TN-I LF-GR--SP

10

20

30

40

50

【 0 1 9 0 】

公共データベース中の既知のセルピン間で、サイピンと最も近いマッチが見出されたのは SCCA-2 であった。配列番号 2 に示すサイピン・アミノ酸配列および配列番号 13 に提供する SCCA-2 アミノ酸配列を比較する G A P 並列を行った。この G A P 比較は、B L O S U M 6 2 アミノ酸置換マトリックスを使用し、そして 8 のギャップ加重および 2 のギャップ長加重を用いた。この並列の結果は、SCCA-2 およびサイピン・ポリペプ

チドが 59.28% の類似性および 51.03% の同一性を有することを示した。

【0191】

サイピン・アミノ酸配列（例えば配列番号 2）に対するアミノ酸置換および他の改変（欠失、挿入など）は、表 2 に示すようなアミノ酸配列の大文字の残基に対する変化を生じるならば、そして特に、これらの変化が類似の構造のアミノ酸での置換（例えば脂肪族残基 - Ala、Gly、Leu、Ile、または Val - のいずれか 1 つの、別の脂肪族残基での置換など）でないか、またはその保存される位での他のセルピン・ポリペプチドに存在する残基での置換でないならば、サイピン・ポリペプチド活性を改変するかまたは破壊する可能性がより高いと予測される。逆に、他の表 2 のセルピン・ポリペプチド配列の 1 つに由来する、並列中のその位の残基の置換を生じるように、変化がサイピン・アミノ酸配列に行われるならば、こうした改変が改変サイピン・ポリペプチドの機能に影響を及ぼすであろう可能性がより低い。例えば、表 2 中のサイピンのアミノ酸 382 に対応するコンセンサス残基はアラニンであるが、PAI2 および SERPINB10 はその位でグリシンを有する。したがって、サイピンの 382 位でのアラニンに対するグリシンの置換は、プロリン、トリプトファンまたはチロシンなどの非常に異なるアミノ酸の置換より、ポリペプチドの機能を改変する可能性がより低い。

10

【0192】

さらに、配列番号 2 に示すサイピン・ポリペプチドのアミノ酸 69 ~ 250 に 95% の同一性を有する部分的ヒト cDNA クローン（AA242969）が、GenBank dbEST データベースに同定された。サイピンのこの領域には、配列番号 2 のアミノ酸 61 ~ 107 に位置する上述のサイピン挿入が含まれる。配列番号 2 のアミノ酸 108 ~ 373 に対応するサイピンの領域は、上述のように、オブ・セルピン構造的コアに対応し、したがって、この EST ポリペプチドは、サイピン構造的コア領域と部分的に重複する。この EST タンパク質は、サイピンと 8 アミノ酸残基異なり、したがって、EST AA242969 が、サイピンのアリル変異体のセグメントに対応する可能性があることが示唆される。あるいは、これらの 8 つの相違の 1 以上が、対応する EST cDNA 配列を決定した際の配列決定の誤りのためであった可能性がある。これらの 8 つの相違の位置は、配列番号 2 のアミノ酸 109、115、118、126、127、216、246 および 248 に対応する。これらの位置で EST に存在するアミノ酸は、それぞれ、スレオニン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニン、アルギニン、イソロイシン、プロリンおよびフェニルアラニンであり、一方、サイピンでは、対応するアミノ酸は、それぞれ、セリン、チロシン、グルタミン、イソロイシン、リジン、リジン、グルタミンおよびチロシンである。EST AA242969 に予測されるポリペプチドは RSL を欠き、したがって、セルピン構造にフォールディング不能であるし、また、サイピン RSL と関連するいかなる生物活性も示しえない。

20

30

【0193】

（実施例 2）

サイピン mRNA の細胞および組織における発現

サイピン・コード配列に基づくオリゴヌクレオチドを逆転写酵素 PCR 反応で用い、cDNA パネルを増幅して、サイピンの発現プロフィールを決定した。この目的のため、エクソン 1、2 および 3 を増幅するオリゴヌクレオチド PCR プライマー対（配列番号 7 および配列番号 8）を用いた。これらのオリゴヌクレオチドを用いて、cDNA の Celler a パネルを増幅した（Bill Lawrence、VM）。逆転写酵素 PCR 産物を解析することによって、サイピン発現が非常に多様な胎児細胞および成人細胞に検出され、これらには以下が含まれた：気管支上皮；前立腺上皮；乳房上皮；および小気道上皮。さらに、サイピンは以下の上皮組織で発現される：前立腺；精巣；胸腺；扁桃腺；皮膚；角化細胞；頸管；胎児小腸；および食道。さらに、サイピンは、以下の癌腫および形質転換細胞株で発現される：肺上皮癌腫（A549）；B 細胞リンパ腫（Akata、Nalm6、Namalwa）；単球起源の癌細胞（U937、Thp-1、AML5）；腫瘍異種移植片（結腸、膵臓、前立腺）。サイピン発現はまた、肺および食道起源の雑多な腫瘍

40

50

でも観察された。

【0194】

(実施例3)

組換えサイピンを発現する宿主細胞

サイピン・タンパク質を発現するため、配列番号5および6に対応するオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、Spe I (5') および Not I (3') 制限エンドヌクレアーゼ部位を含めて、全長サイピン cDNA を PCR 増幅した。サイピン遺伝子を中間体クローニングベクターにクローニングし、遺伝子を Ig カッパ・シグナル配列、短い FLAG (登録商標) タグ (DYKD)、およびポリ HIS タグの下流に置いた。この全融合構築物を Sal I - Not I 断片として pDC412 にサブクローニングした。ポリ HIS およびサイピン・コード配列間のスパーサーとして、アミノ酸 GTSS を用いた。Id カッパ・シグナルを含んで、細胞外区画に発現タンパク質を導き、すなわち、発現サイピンの分泌を確実にした。サイピンの開始メチオニンまでの融合構築物のアミノ酸配列を以下に示す：

ME T D T L L L W V L L L W V P G S T G D Y K D E G S H H H H H G T S S - サイピン

上記左に示す37アミノ酸のN末端融合構築物配列を配列番号15として提供する。この pDC412 - サイピン・プラスミドを、分泌サイピン・ポリペプチド発現のため、COS-1サル腎臓細胞にトランスフェクションした。

【0195】

限定されるわけではないが、遠心分離、サイズ排除ろ過およびクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、SDS-PAGE、等電点電気泳動、二次元電気泳動、ウェスタンブロット解析、放射性核種標識、アフィニータグ標識、免疫沈降およびアフィニータグ沈降を含む慣用法によって、トランスフェクション細胞溶解物および上清を採取し、精製し、そしてサイピン発現に関して解析した。リン酸化およびグリコシル化を含む翻訳後修飾に関して、精製タンパク質を調べることが可能である。多様なプロテアーゼとの熱および変性耐性複合体形成に関して、精製タンパク質を試験するであろう。サイピンの阻害活性は、Potempaら(1994)に論じられるように、ポリ硫酸化オリゴ糖などの補因子の添加によって、安定化するかまたは増大させることが可能である。

【0196】

(実施例4)

本発明のポリペプチドに結合するモノクローナル抗体

本実施例は、サイピン・ポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を調製する方法を例示する。米国特許第4,411,993号に記載されるものなどの他の慣用的技術が使用可能である。こうした抗体を生成するのに使用可能な適切な免疫原には、限定されるわけではないが、精製サイピン・ポリペプチド、その免疫原性断片、および高レベルのサイピン・ポリペプチドまたはその免疫原性断片を発現する細胞が含まれる。免疫原性断片は、一般的に少なくとも12以上のアミノ酸を含有する。例えば Pardoll および Beckerleg によって、Immunity 3:165, 1995 に概説されるように、サイピン・ポリペプチドをコードするDNAもまた、免疫原として使用可能である。

【0197】

げっ歯類(例えばBALB/cマウスまたはLewisラット)を、アジュバント(例えば完全または不完全フロイントアジュバント、ミョウバン、またはRibiアジュバントR700(Ribi、モンタナ州ハミルトン)などの別のアジュバント)中で乳化したサイピン・ポリペプチド免疫原で免疫し、そして10~100μgの範囲で、皮下または腹腔内注射する。DNAは皮内(Razら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519)または筋内(Wangら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4156)投与することが可能である; DNAに基づく抗原には、生理食塩水が適切な希釈剤であることが見出

10

20

30

40

50

されている。10日～3週間後、毎週、隔週、または3週間ごとの免疫スケジュールで、さらなる免疫原および定期的な追加免疫で、免疫動物に追加免疫する。

【0198】

後眼窩出血または尾先端切除によって、血清試料を定期的に採取し、ドットブロットアッセイ、ELISA（酵素連結免疫吸着アッセイ）、免疫沈降、またはサイピン・ポリペプチド結合パートナーへのサイピン・ポリペプチドの結合阻害のFACS解析などの他の適切なアッセイによって、サイピン・ポリペプチド抗体に関して試験する。適切な抗体価を検出した後、陽性動物に、生理食塩水中のサイピン・ポリペプチドを最後に一度、静脈内注射する。3～4日後、動物を屠殺し、そして脾臓細胞を採取し、そしてネズミ骨髄腫細胞株、例えばNS1または好ましくはP3×63Ag8.653（ATCC CRL-1580）に融合させる。これらの細胞融合によってハイブリドーマ細胞が生成され、これを、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）選択培地中、マルチマイクロタイタープレートに蒔く。

10

【0199】

ハイブリドーマ細胞は、Engvallら（*Immunochem.* 8:871, 1971）および米国特許第4,703,004号に開示される技術の適応によって、精製したサイピン・ポリペプチドに対する反応性に関して、ELISAによってスクリーニングすることが可能である。好ましいスクリーニング技術は、Beckmannら（*J. Immunol.* 144:4212, 1990）に記載される抗体捕捉技術である。サイピン特異的抗体は、サイピンに結合するであろうが、SCCA-1、SCCA-2、ハーピン、プロスタピン、ボマピン、PAI2またはLEIを含む他のセルピンには結合しないであろう。サイピン特異的抗体を産生するハイブリドーマ細胞を、同系げっ歯類に腹腔内注射して、高濃度の（例えばミリリットルあたり1ミリグラムを越える）抗サイピン・ポリペプチドモノクローナル抗体を含有する腹水を産生することが可能である。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、多様な技術によって、フラスコまたはローラーボトル中、*in vitro*で増殖させてもよい。モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿によって、続いてゲル排除クロマトグラフィーによって、精製可能である。あるいは、プロテインAまたはプロテインGに対する抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーもまた使用可能であり、サイピン・ポリペプチドへの結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーも使用可能である。

20

30

【0200】

（実施例5）

染色体マッピング

NCBIヒトゲノムマッピング供給源ウェブページ上、BLASTプログラムを用いて、ヒト染色体にサイピン遺伝子をマッピングした。このBLAST解析の結果は、サイピンがヒト染色体18q21.3のセルピン・クラスター内に位置し、そしてハーピン（18q21.3-q22に位置；Springら，*Biochem Biophys Res Comm* 264:299（1999））およびマスピン遺伝子（Schneiderら，*Proc Natl Acad Sci USA* 92:3147（1995））の間にマッピングされることを示した。18q21.3にマッピングされるセルピンには：Serpina5（PI-5、マスピン）；Serpina13（PI-13、ハーピン、ヘッドピン）；Serpina3（SCCA-1）；Serpina7（PI-11、メグシン）；Serpina2（PAI-2）；Serpina10（PI-10、ボマピン）；およびSerpina8（PI-8、CAP2）が含まれる。これらのセルピンは、遠位からセントロメアに連続した順で、NCBIヒトゲノム18qコンティグNT_010986.2上に位置する。

40

【0201】

（実施例6）

リアルタイム定量的PCRによるサイピン発現の解析

50

多様な組織供給源から、そして多様な化合物で処理した細胞または組織から、RNA試料を得た：これらのRNA試料には、商業的に入手可能なRNA (Ambion、テキサス州オースティン；Clontech Laboratories、カリフォルニア州パロアルト；およびStratagene、カリフォルニア州ラホヤ)が含まれた。ランダム六量体を用い、製造者の指示にしたがって、RNA試料をDNアーゼ処理 (パーツ# 1906、Ambion、テキサス州オースティン)、そしてTaqMan逆転写試薬 (パーツ# N808-0234、Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティー)を用いて、cDNA分子集団に逆転写した。ウェルあたり5 ngまたは20 ngいずれかで、cDNA分子の各集団をマルチウェルプレートの特定のウェルに入れ、そして三つ組で実行した。同一組織種および刺激条件を適用したが異なるドナーから収集した場合、プールしたものをを用いた。試料の各マルチウェルプレートには陰性対照セルを含んだ。

10

【0202】

Primer Expressソフトウェア (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティー)を用いて、サイピン・ポリペプチドをコードするmRNAに相補的なプローブおよびオリゴヌクレオチドプライマーのセットを設計し、そして合成し、そしてこれらのプローブ/プライマーセットのPCR条件を最適化して、ほぼ周期20および周期36の間のすべての熱周期で、安定で、そして対数増加するPCR産物を生じた。用いた順方向プライマーは、900 nMの濃度の5' - AACGACAGAGCCTCTGGATCAG - 3' (配列番号16)

20

であり；用いた逆方向プライマーは、300 nMの濃度の5' - GAGAAAGCTGCCCAAAGTAGCA - 3' (配列番号17)

であった。サイピン用に用いたFAM標識プローブは、200 nMの濃度の5' - CAGTCCGCTCTCATTTGTTTAAGGACCCAG - 3' (配列番号18)

であった。18S RNAに、そして特定の「ハウスキーパー」タンパク質 - ベータ - アクチン、HPR T (ヒポキサンチン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ)、DHFR (ジヒドロ葉酸レダクターゼ)、PKG (ホスホグリセリン酸キナーゼ)、およびGAPDH (グリセロアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ) - をコードするmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドプライマーセットを合成し、そしてこれらのプライマーセットに関してまた、PCR条件を最適化した。例えば、ハウスキーピング遺伝子HPR Tの順方向および逆方向プライマー濃度は、各々300 nMであり、そしてVIC標識プローブ (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティー)は200 nMで用いた。サイピンおよびHPR Tプローブ/プライマーセット両方を用いるマルチプレックスTAQMAN PCR反応は、Applied Biosystems Prism 7700配列検出系上、TAQMANユニバーサルPCRマスターミックス (パーツ# 4304437、Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティー)を用いて、25マイクロリットル体積中にセットアップした。Sequence Detectorソフトウェア1.7a (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティー)を用いて、閾値周期値 (C_T)を決定し、そしてサイピンをHPR Tに相対発現比較するため、デルタ C_T (平均FAM値から平均VIC値を減じたもの)を計算して、 $2^{-\Delta C_T}$ 、2のマイナスデルタ C_T 乗に変換した。

30

40

【0203】

多様な成人および胎児RNA試料におけるHPR T発現に比較したサイピン発現の解析は、サイピンが少数の成人および胎児組織において、HPR Tより少なく発現されることを示し、成人精巣および子宮において、相対発現は最低であった (以下を参照されたい)；0.00710639の比は、サイピン発現が、HPR Tのものの1%未満であることを示す。対照的に、成人皮膚において、サイピンはHPR Tより約28倍より豊富に発現される。

50

【 0 2 0 4 】

【 表 3 】

試料	サイピン 平均 CT	HPRT 平均 CT	サイピン:HPRT の比	最小値 (誤差 を減じた)	最大値 (誤 差を加えた)
成人精巣	34.3867	27.25	0.00710639	0.00624469	0.008087
成人子宮	32.9067	30.067	0.13966089	0.12738358	0.1531215
成人胸腺	31.8633	30.393	0.3609823	0.33180107	0.39273
胎児結腸	31.56	30.103	0.36433395	0.3287549	0.4037635
胎児骨格筋	31.73	30.407	0.39961057	0.33446684	0.4774423
成人皮膚	25.1133	29.94	28.3773245	25.9267212	31.05956

10

【 0 2 0 5 】

骨への分化中のヒト間葉幹細胞由来のRNA試料において、HPRT発現に比較したサイピン発現の解析は、サイピン発現が分化中に増加するが、なおHPRTよりはるかにより低いレベルで発現されることを示した（以下を参照されたい）。

【 0 2 0 6 】

20

【 表 4 】

試料	サイピン 平均 CT	HPRT 平均 CT	サイピン:HPRT の比	最小値 (誤差 を減じた)	最大値 (誤差 を加えた)
MSC 骨第 0 日	39.3633	29.053	0	0	0
MSC 骨 24 時間	35.15	29.24	0.0166308	0.0131106	0.0210961
MSC 骨 1 週間	34.8533	29.977	0.034039	0.0311515	0.0371942
MSC 骨 4.5 週間	34.9733	30.613	0.0486978	0.0381139	0.0622207

30

【 0 2 0 7 】

多様なサイトカイン処理（以下を参照されたい）に曝露した、正常ヒト気管支組織（「NHBE」）の肺上皮細胞由来のRNA試料において、HPRT発現に比較したサイピン発現を解析した。この実験は、インターロイキン - 4（IL - 4）およびインターロイキン - 13（IL - 13）の組み合わせがサイピン発現を増加させる一方、インターフェロン - ガンマ（IFN γ ）、またはインターロイキン - 1（IL - 1）、インターロイキン - 18（IL - 18）、および腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）の組み合わせでの処理がサイピン発現を減少させたことを示す。さらに、IL - 4およびIL - 13の組み合わせによるサイピンの特異的上方制御もまた、初代肺小気道上皮細胞（SAEC）で、そして肺腺癌上皮細胞（Calu3）での実験で、観察された。これらの結果は、プロテアーゼ阻害剤サイピンの上方制御が、炎症誘導プロテアーゼに対する肺上皮反応に参与している可能性があることを示唆する。

40

【 0 2 0 8 】

【 表 5 】

試料	サイピン 平均 CT	HPRT 平均 CT	サイピン:HPRT の比	最小値(誤差 を減じた)	最大値(誤差 を加えた)
NHBE 刺激なし	31.4233	29.203	0.2146414	0.1945253	0.2368376
NHBE IL4/IL13	31.11	29.757	0.3913867	0.370097	0.4139011
NHBE IL1/IL18/TNFα	32.0967	29.347	0.1486509	0.1268492	0.1741996
NHBE gIFN	33.98	30.167	0.0711332	0.0629347	0.0803997
SAEC 刺激なし	36.9367	29.13	0	0	0
SAEC IL4/IL13	34.5667	29.037	0.0216423	0.0164463	0.02848
SAEC IL1/IL18/TNFα	36.3967	28.533	0	0	0
SAEC IFNγ	38.39	28.987	0	0	0
Calu3 刺激なし	38.13	28.527	0	0	0
Calu3 IL4/IL13	35.8167	28.88	0.0081631	0.0070136	0.009501
Calu3 IL1/IL18/TNFα	38.21	28.22	0	0	0
Calu3 IFNγ	39.5	28.257	0	0	0

10

20

【0209】

(実施例7)

シンテニー解析によるマウス・オブ・セルピン遺伝子の同定

我々は、1つのマウス・サイピン相同体、並びにヒトSERPINB3、SERPINB4、SERPINB10、およびSERPINB13に相同な4つの新規マウス・オブ・セルピン遺伝子を同定した。これらのマウス遺伝子は、ヒト染色体18と類似の組成を持つ、オブ・セルピンのシンテニークラスター中、マウス染色体1にマッピングされる。図1は、ヒト染色体18およびマウス染色体1オブ・セルピンの遺伝子マップを示し、染色体間の大規模なシンテニー組成を示す。4つの新規ゲノム・オブ・セルピン配列の同定および先に注釈が付けられていなかったcDNAが、染色体1上のマウス・オブ・セルピン相同性を拡張し、そして既知のヒト染色体18のオブ・セルピンの相同分子種提示を完了する。

30

【0210】

公共(NT 010986.2)およびCelera Genomics(CHGD R26B、GA__X2HTBL3HLMK)ゲノム骨格のBLAST解析によって、サイピンは、およそ400キロ塩基のゲノム領域に渡る、10の染色体18オブ・セルピンの隣接クラスター中に位置決定された。同定された10のオブ・セルピン遺伝子には、公共ドメイン中に注釈が付けられた8つ(SERPINB2、PAI2; SERPINB3、SCCA1; SERPINB4、SCCA2; SERPINB5、マスピン; SERPINB7、メグシン; SERPINB8、PI8; SERPINB10、ボマピン; SERPINB13、ハーピン)、Derwent特許データベースに見出された1つ(SERPINB11、プロスタピン)およびサイピンが含まれる(寄託番号に関しては、表3を参照されたい)。NCBI LocusLink(SERPINB2およびSERPINB4)およびBLAST解析を用いて、ヒト染色体18オブ・セルピンの10のうち7に対して、相同マウスcDNAの最適マッチング(アミノ酸同一性%)を編集するか、または同定した(表3)。我々は、GenBankデータベースには、SERPINB3、SERPINB10、またはSERPINB13に関して、優れたマウスcDNAマッチを見出さなかった。しかし、我々は、これらの3つのセルピンに関して、Celera Ge

40

50

nomics由来のマウスゲノムデータベースを検索するBLASTによって、高い度合いのマッチを見出した。翻訳されるマウスタンパク質は、SERPINB3、SERPINB10およびSERPINB13にマッチし、それぞれ、Genomicb3、Genomicb10、およびGenomicb13と名づけた。我々はまた、SERPINB4に（高い配列類似性のため、SERPINB3にも）相同である別のマウスゲノム配列も発見し、これを翻訳して、そしてGenomicb4と名づけた。マウスGenomicb3、Genomicb4、Genomicb10、およびGenomicb13に関して予測されるタンパク質配列を、視覚的にイントロン/エクソン結合部で編集し、ヒト配列と最適にフィットするようにして、それぞれ配列番号19～22に提供する。マウスGenomicb4（配列番号20）およびGenomicb13（配列番号22）のみが完全なようである。Genomicb10マウスタンパク質は、エクソン7のスプライシング部位でコード配列の25アミノ酸を欠く。Genomicb3マウス配列は、配列番号19のアミノ酸123の後で停止コドンをもつようであり；これが配列決定の誤りによる人為的産物であるのかどうかは不明である。これらのマウス・セルピン・ポリペプチド配列は各々、RSL中に予測される切断部位をもつ：配列番号19のアミノ酸352および353の間；配列番号20のアミノ酸352および353の間；配列番号21のアミノ酸332および333の間；並びに配列番号22のアミノ酸354および355の間。我々はいまだに、これらの推定上の遺伝子のいずれがcDNAをコードすることも確認していない。しかし、これらは、以下に論じる、マウスおよびヒト染色体オブ・セルピン・クラスター解析において、マーカーとして有用である。SERPINB3およびSERPINB4を除いて、染色体18オブ・セルピンのすべてに関して、ユニークなマウスゲノム相同体が同定された。3つのcDNAは、NCBI LocusLinkにおいてSERPINBのマウス相同体として注釈付けされ（AF063937、AK003220およびAK003650）、そしてすべて、少なくとも部分的に、マウスゲノム中に示された。染色体1骨格CMGD R12C GA__X5J8B7W5VAQ（1,928,040bp）上のAF063937の最初の176ヌクレオチドに関してしか、正確なゲノムマッチを見出すことができず、これは、開始メチオニンからアミノ酸56までの完全エクソンをコードする。マウス染色体1 CMGD R12CコンティグGA__X5J8B7W2TTH（39,633bp）上のAK003220に関しては、正確なコード配列マッチを、そしてゲノム骨格CMGD R12C GA__X5J8B7W4D6C（2,012,083bp）上のAK003650の大部分の正確なコード配列マッチを同定した。AK003650の最初の73アミノ酸ゲノムコード配列は発見しなかった。これは、いまだに結び付けられていない、3つの異なる染色体1領域に、3つの関連するSerpinb4マウス相同体を置く。GA__X5J8B7W5VAQ上にGenomicb3およびGenomicb4が本明細書で同定されたため、3つのゲノムコンティグ/骨格上に、総数5の異なるマウスSERPINB3/B4相同体がある（表3を参照されたい）。

10

20

30

40

【0211】

表3

【0212】

【表6】

セルピン	ヒト		% ID	マウス	
	寄託番号	染色体		寄託番号	染色体
B2	P05120	18q21.3	75	NM_011111	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B3	P29508	18q21.3	58	Genomicb3 ^a	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
B4	P48594	18q21.3	60	AF063937 ^b	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
			60	Genomicb4 ^a	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
			59	AK003220 ^b	1 (GA_X5J8B7W2THH)
			57	AK003650 ^b	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B5	P36952	18q21.3	89	NM_009257	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
B7	XP_036922	18q21.3	73	AK014524	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B8	P50452	18q21.3	78	NM_011459	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B10	P48595	18q21.3	72	Genomicb10 ^a	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B11	gsp Y15155	18q21.3	64	AK009003	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B12	サイピン	18q21.3	72	AK009018	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
B13	Q9UIV8	18q21.3	74	Genomicb13 ^a	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)

10

20

30

40

【0213】

ヒト染色体18オブ-セルピンは、表3において、最高パーセント同一性マウス配列マッチ (BLAST: GCG、ウィスコンシン州マディソン) と共に提示される。ヒト注釈付きタンパク質配列 (ヒト-寄託番号) をマウス翻訳ヌクレオチド配列 (マウス-寄託番号) に比較した。ヒト参考文献は、サイピンおよびY15155 (Derwentデータベース) を除いて、NCBIタンパク質クエリー、ncbi.nlm.nih.gov: 80/entrez/query.fcgi?db=Proteinを通じて入手可能である。マウス配列は、「Genomic」(^a) と示す場合を除いて、NCBIから得た全長cDNAである。これらの「Genomic」配列は、マウスゲノムに同定される、ヒト対応物の予測される全長マウス相同性である (Celera Genomics、メリーランド州ロックビル)。ヒトおよびマウス配列の全体の並列からの最適概算に基づいて、経験的に、ゲノム配列エクソンをスプライシングした。示した配列同一性パーセントは、翻訳されるcDNA配列、または翻訳されるゲノム配列に比較した、注釈付きヒトタンパク質に関してのものである (%ID)。すべての注釈付きcDNAに関する完全配列マッチは、3つの独立のマウス染色体1ゲノムコンティグ/骨格 (マウス-染色体) 上に位置決定された。(^b) AF063937、AK003220、およびAK003650は、すべてマウスSerpinaB4相同体 (SCCA2、LocusID 20248) として、NCBI LocusLink中に注釈付けされる。

【0214】

ヒト・オブ-セルピン間で共有される高い配列類似性はまた、マウスメンバーでも保存される (以下の表4を参照されたい)。上部右の対角線 (太字) は、全タンパク質の配列同一性パーセントを示す。下部左の対角線は、RSL全体 (P17からP4') の同一性を示す。セルピン・スーパーファミリーに同定される非常に保存される残基の大部分もまた、ヒトおよびマウスタンパク質配列両方で保存される。

【0215】

表4 ヒトおよびマウス・オブ-セルピン・アミノ酸配列比較

【0216】

【表7】

50

	HsB3	HsB4	AF063937	AK003220	AK003650	Genmcb3	Genmcb4
HsB3	100	91	59	59	55	57	59
HsB4	66	100	60	59	57	59	60
AF063937	52	57	100	86	82	85	79
AK003220	66	57	90	100	84	81	76
AK003650	29	33	62	62	100	78	74
Genmcb3	43	43	62	62	38	100	78
Genmcb4	48	52	48	48	33	43	100

10

【 0 2 1 7 】

(実施例 8)

ヒト・セルピン・ファミリーのさらなる新規メンバーの同定

サイピンを同定するのに用いたのと同じの方法を用いて、ヒト・セルピン・ポリペプチドファミリーの5つのさらなる新規メンバー：IMX96506、IMX96866、IMX96983、IMX98220、およびIMX96909を同定した。これらの新規ヒト・セルピンを各々、以下に順番に記載する。

【 0 2 1 8 】

IMX96506。IMX96506ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号23に示す；配列番号24および配列番号25は、配列番号23の下位配列である。配列番号23は、配列番号23のアミノ酸377～379にRSK配列を有し；切断部位はArg-377およびSer-378の間と予測される。上述のようにGeneFoldアルゴリズムを用いて解析すると、IMX96506ポリペプチドは、すべてのカテゴリーで、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤IIIおよびアルファ・アンチトリプシンに最大スコア(999.9のスコア)を有する。

20

【 0 2 1 9 】

IMX96866。IMX96866ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号26に示す。らせん間可変ループ領域を有するが、RSLドメインに伸長していないため、IMX96866ポリペプチドのアミノ酸配列は不完全であるようである。しかし、GeneFoldアルゴリズムを用いて解析すると、IMX96866ポリペプチドもまた、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤IIIおよびアルファ・アンチトリプシンに最大スコアを有する。また、IMX96866は、ラットおよびマウス・カリクレイン結合タンパク質に配列類似性を示す。

30

【 0 2 2 0 】

IMX96983。IMX96983ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号27に示す；配列番号28は配列番号27の下位配列である。IMX96983ポリペプチドのアミノ酸配列は、オブ・セルピンに比較して、かなりのN末端伸長(およそ197アミノ酸)を有し；また、「VLK」アミノ酸配列(配列番号27のアミノ酸544～546)もまた有し、そしてオブ・セルピンの特徴的なC末端残基を欠くようである。しかし、GeneFoldアルゴリズムを用いて解析すると、IMX96983ポリペプチドもまた、すべてのカテゴリーで、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤IIIおよびアルファ・アンチトリプシンに最大スコアを有する。IMX96983ポリペプチドは、ネクシンおよびニューロセルピンに類似性を示す。

40

【 0 2 2 1 】

IMX98220。IMX98220ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号29に示す；配列番号30および配列番号31は配列番号29の下位配列である。IMX98220ポリペプチドは、細胞質アンチ・プロテイナーゼ3(CAP-3)に配列類似性を示す。

【 0 2 2 2 】

IMX96909。IMX96909ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号32に示す

50

；配列番号 33 は配列番号 32 に非常に類似のヒトポリペプチド配列である。配列番号 34 は、配列番号 32 のアミノ酸 252 ~ 262 が配列番号 34 のアミノ酸 252 ~ 257 と交換されている点で、配列番号 32 と異なる；この相違は、スプライシング変異または天然存在多型に対応する可能性がある。配列番号 35 は配列番号 34 の下位配列である。GeneFold アルゴリズムを用いて解析した際、IMX96909 ポリペプチドは、すべてのカテゴリーで、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤 III およびアルファ - アンチトリプシンに最大スコアを有する。

【0223】

(実施例 9)

サイピン核酸発現のアンチセンス阻害

10

本発明にしたがって、オリゴヌクレオチド設計の基礎として、配列番号 1 のヌクレオチド配列を用いて、サイピン mRNA 分子の異なる領域を標的とする、一連のオリゴヌクレオチドを設計する。オリゴヌクレオチドは、長さおよそ 10、12、15、18、またはより好ましくは 20 ヌクレオチド残基であるように、そして少なくとも 37 の予測されるハイブリダイゼーション温度を有するように選択する。好ましくは、いくつかは mRNA 分子の 5' 領域に向かってハイブリダイズし、他のものがコード領域に、そしてさらに他のものが mRNA 分子の 3' 領域にハイブリダイズするであろうように、オリゴヌクレオチドを選択する。

【0224】

オリゴヌクレオチドは、全体がホスホロチオエート主鎖（ヌクレオシド間連結）を持つオリゴデオキシヌクレオチドであることが可能であるし、または多様な異なる種類のヌクレオシド間連結を有することが可能である。一般的に、多様な化学的修飾オリゴヌクレオチドの調製、精製、および使用が米国特許第 5,948,680 号に記載される。特定の例として、ヌクレオシドホスホロアミダイトの以下の種類をオリゴヌクレオチド合成に使用可能である：デオキシおよび 2' - アルコキシアミダイト；2' - フルオロデオキシアデノシンアミダイト、2' - フルオロデオキシグアノシン、2' - フルオロウリジン、および 2' - フルオロデオキシシチジンなどの 2' - フルオロアミダイト；2,2' - アンヒドロ [1 - (ベータ - D - アラビノ - フラノシル) - 5 - メチルウリジン]、2' - O - メトキシエチル - 5 - メチルウリジン、2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルウリジン、3' - O - アセチル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルウリジン、3' - O - アセチル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチル - 4 - トリアゾールウリジン、2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン、N4 - ベンゾイル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン、および N4 - ベンゾイル - 2' - O - メトキシエチル - 5' - O - ジメトキシトリチル - 5 - メチルシチジン - 3' - アミダイトなどの 2' - O - (2 - メトキシエチル) - 修飾アミダイト；2' - (ジメチルアミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイト、5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - O² - 2' - アンヒドロ - 5 - メチルウリジン、5' - O - tert - ブチル - ジフェニルシリル - 2' - O - (2 - ヒドロキシエチル) - 5 - メチルウリジン、2' - O - ([2 - フタルイミドオキシ]エチル) - 5' - tert - ブチルジフェニル - シリル - 5 - メチル - ウリジン、5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [(2 - ホルマドクスイミノオキシ)エチル] - 5 - メチルウリジン、5' - O - tert - ブチルジフェニルシリル - 2' - O - [N, N - ジメチルアミノオキシエチル] - 5 - メチルウリジン、2' - O - (ジメチルアミノオキシエチル) - 5 - メチルウリジン、5' - O - DMT - 2' - O - (ジメチルアミノオキシエチル) - 5 - メチルウリジン、および 5' - O - DMT - 2' - O - (2 - N, N - ジメチルアミノオキシエチル) - 5 - メチルウリジン - 3' - [(2 - シアノエチル) - N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト]などの 2' - O - (アミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイトおよび 2' - O - (ジメチルアミノオキシエチル)ヌクレオシドアミダイト；並びに N2 - イソブチリル - 6 - O - ジフェニル - カルバモイル - 2' -

20

30

40

50

O - (2 - エチルアセチル) - 5 ' - O - (4 , 4 ' - ジメトキシトリチル) グアノシン - 3 ' - [(2 - シアノエチル) - N , N - ジイソプロピルホスホロアミダイト] などの 2 ' - (アミノオキシエトキシ) ヌクレオシドアミダイト。

【 0 2 2 5 】

修飾オリゴヌクレオシドもまた、オリゴヌクレオチド合成に使用可能であり、例えば、MMI 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれる、メチレンメチルイミノ連結オリゴヌクレオシド；MDH 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれる、メチレン - ジメチルヒドラゾ連結オリゴヌクレオシド；アミド - 3 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれる、メチレン - カルボニルアミノ連結オリゴヌクレオシド；およびアミド - 4 連結オリゴヌクレオシドとも呼ばれる、メチレン - アミノカルボニル連結オリゴヌクレオシドと共に、例えば交互にMMI および P = O または P = S 連結を有する混合主鎖化合物があり、これらは、米国特許第 5 , 3 7 8 , 8 2 5 号、第 5 , 3 8 6 , 0 2 3 号、第 5 , 4 8 9 , 6 7 7 号、第 5 , 6 0 2 , 2 4 0 号および第 5 , 6 1 0 , 2 8 9 号に記載されるように調製する。ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル連結オリゴヌクレオシドもまた、使用可能であり、そしてこれらは米国特許第 5 , 2 6 4 , 5 6 2 号および第 5 , 2 6 4 , 5 6 4 号に記載されるように調製し；そして、エチレンオキシド連結オリゴヌクレオシドもまた、使用可能であり、そしてこれは米国特許第 5 , 2 2 3 , 6 1 8 号に記載されるように調製する。上述のオリゴヌクレオチドと同じ方式で、ペプチド核酸 (P N A s) が使用可能であり、そして Peptide Nucleic Acids (PNA) : Synthesis , Properties and Potential Applications , Bioorganic & Medicinal Chemistry , 1996 , 4 , 5 - 23 ; 並びに米国特許第 5 , 5 3 9 , 0 8 2 号、第 5 , 7 0 0 , 9 2 2 号、および第 5 , 7 1 9 , 2 6 2 号に引用される多様な方法のいずれかにしたがって調製する。

【 0 2 2 6 】

本発明のキメラオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、または混合オリゴヌクレオチド / オリゴヌクレオシドは、いくつかの異なる種類であることが可能である。これらには、連結ヌクレオチドの「ギャップ」セグメントが連結ヌクレオシドの 5 ' および 3 ' 「ウィング」セグメントの間に位置する第一の種類、並びに「ギャップ」セグメントがオリゴマー化合物の 3 ' または 5 ' 末端いずれかに位置する第二の「オープン端」型が含まれる。第一の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ギャップマー」またはギャップ化オリゴヌクレオチドとしても知られる。第二の種類のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野において、「ヘミマー」または「ウィングマー」としても知られる。異なる種類のキメラオリゴヌクレオチドのいくつかの例は：[2 ' - O - Me] - - [2 ' - デオキシ] - - [2 ' - O - Me] キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、[2 ' - O - (2 - メトキシエチル)] - - [2 ' - デオキシ] - - [2 ' - O - (メトキシエチル)] キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、および [2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ホスホジエステル] - - [2 ' - デオキシホスホロチオエート] - - [2 ' - O - (2 - メトキシエチル) ホスホジエステル] キメラオリゴヌクレオチドであり、これらはすべて、米国特許第 5 , 9 4 8 , 6 8 0 号にしたがって調製可能である。1 つの好ましい態様において、両端 (5 ' および 3 ' 方向) で 4 ヌクレオチド「ウィング」が隣接する、10 の 2 ' デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成される、長さ 18 ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド (「ギャップマー」) を利用する。ウィングは 2 ' - メトキシエチル (2 ' - MOE) ヌクレオチドで構成される。ヌクレオシド間 (主鎖) 連結は、オリゴヌクレオチド全体でホスホロチオエート (P = S) である。2 ' - MOE ウィング中のシチジン残基は、5 - メチルシチジンである。他のキメラオリゴヌクレオチド、キメラオリゴヌクレオシド、および混合キメラオリゴヌクレオチド / オリゴヌクレオシドは、米国特許第 5 , 6 2 3 , 0 6 5 号にしたがって合成する。

【 0 2 2 7 】

オリゴヌクレオチドは、好ましくは、標準的 96 ウェル形式で 96 の配列を同時に組み立てることが可能な自動化合成装置上、固相 P (I I I) ホスホロアミダイト化学合成を介

10

20

30

40

50

して合成する。各ウェルのオリゴヌクレオチド濃度は試料希釈およびUV吸光分光法によって評価する。個々の産物の全長完全性はキャピラリー電気泳動によって評価し、そして塩基および主鎖組成は、エレクトロスプレー質量分析を利用した化合物のマス解析によって確認する。

【0228】

標的核酸発現に対するアンチセンス化合物の影響は、標的核酸が測定可能なレベルで存在する限り、多様な細胞種のいずれで試験することも可能である。これは、例えば、PCRまたはノーザンブロット解析を用いて、日常的に測定可能である。細胞は、供給者に推奨されるように、10継代まで日常的に維持する。細胞が80%~90%集密に達したら、オリゴヌクレオチドで処理する。96ウェルプレートで増殖させた細胞に関しては、200マイクロリットルのOPTI-MEM-1血清減少培地(Gibco BRL)でウェルを1度洗浄し、そしてその後、3.75g/ml LIPOFECTIN(Gibco BRL)および最終濃度150nMの所望のオリゴヌクレオチドを含有する130マイクロリットルのOPTI-MEM-1で処理する。4時間の処理後、培地を新鮮な培地と交換する。オリゴヌクレオチド処理の16時間後、細胞を採取する。好ましくは、オリゴヌクレオチドが標的核酸分子の異なる部分にハイブリダイズする場合、標的核酸発現を最大の度合いで阻害するオリゴヌクレオチドを同定するため、いくつかの異なるオリゴヌクレオチドの影響を同時に試験すべきである。

10

【0229】

サイピン核酸発現のアンチセンス変調は、当該技術分野に知られる多様な方法でアッセイ可能である。例えば、サイピンmRNAレベルは、例えばノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、またはリアルタイム逆転写酵素PCR(RT-PCR)によって、定量化可能である。リアルタイム定量的RT-PCRが現在好ましい。RNA解析は、総細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAに対して行うことが可能である。RNA単離およびノーザンブロット解析法は、例えば、Ausubel, F. M.ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, pp. 4.1.1-4.2.9および4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1996に解説される。リアルタイム定量的(PCR)は、PE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティから入手可能な、商業的に入手可能であり、そして製造者の指示にしたがって用いる、ABI PRISM 7700配列検出系を用いて、好適に達成可能である。この蛍光検出系は、PCR産物の高処理定量化を可能にする。PCRが完了した後に増幅産物を定量化する標準的PCRとは逆に、リアルタイム定量的PCRの産物は、集積するにつれて定量化される。これは、順方向および逆方向PCRプライマー間に特異的にアニーリングし、そして2つの蛍光色素を含有するオリゴヌクレオチドプローブをPCR反応に含むことによって、達成される。レポーター色素(例えばOperon Technologies Inc.、カリフォルニア州アラメダ、またはPE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティいずれかから得られる、JOEまたはFAM)をプローブの5'端に付着させ、そして消光剤色素(例えばOperon Technologies Inc.、カリフォルニア州アラメダ、またはPE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティいずれかから得られる、TAMRA)をプローブの3'端に付着させる。プローブおよび色素が損なわれていなければ、レポーター色素発光は、3'消光剤色素が近接していることによって、消光される。増幅中、標的配列へのプローブのアニーリングにより、Taqポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性によって切断可能な基質が生じる。PCR増幅周期の伸長期中、Taqポリメラーゼによるプローブの切断が、残りのプローブから(そしてしたがって消光剤部分から)レポーター色素を放出し、そして配列特異的蛍光シグナルが生成される。各周期で、さらなるレポーター色素分子が各プローブから切断され、そしてABI PRISM 7700配列検出系に内蔵されたレーザー光学装置によって規則的(6秒間)間隔で、蛍光強度を監視する。各アッセイで、未処理対照試料由来のmRNAの

20

30

40

50

連続希釈を含有する、一連の平行反応によって、標準曲線を生成し、これを用いて、試験試料をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した後の阻害パーセントを定量化する。定量的PCR解析の他の方法もまた、当該技術分野に知られる。サイピン・タンパク質レベルは、当該技術分野に公知の多様な方法によって定量化可能であり、これらには、免疫沈降、ウェスタンブロット解析（イムノブロッティング）、ELISA、または蛍光活性化細胞分取（FACS）がある。サイピン・ポリペプチドに向けられる抗体は、本明細書に記載するものなどの慣用的抗体生成法を介して、調製可能である。免疫沈降法、ウェスタンブロット（イムノブロット）解析、および酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）は、当該技術分野で標準的である（例えばAusubel, F. M.ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, pp. 10.16.1-10.16.11, 10.8.1-10.8.21, および11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991を参照されたい）。

10

【0230】

本明細書に引用する刊行物および特許出願はすべて、各個々の刊行物または特許出願が特に、そして個々に、本明細書に援用されると示されたかのように、本明細書に援用される。前述の発明は、理解を明らかにする目的で、例示および実施例によってある程度詳細に記載されているが、本発明の解説に鑑みて、付随する請求項の精神または範囲から逸脱することなく、特定の変化および修飾を施すことが可能であることが、当業者には容易に明らかであろう。

20

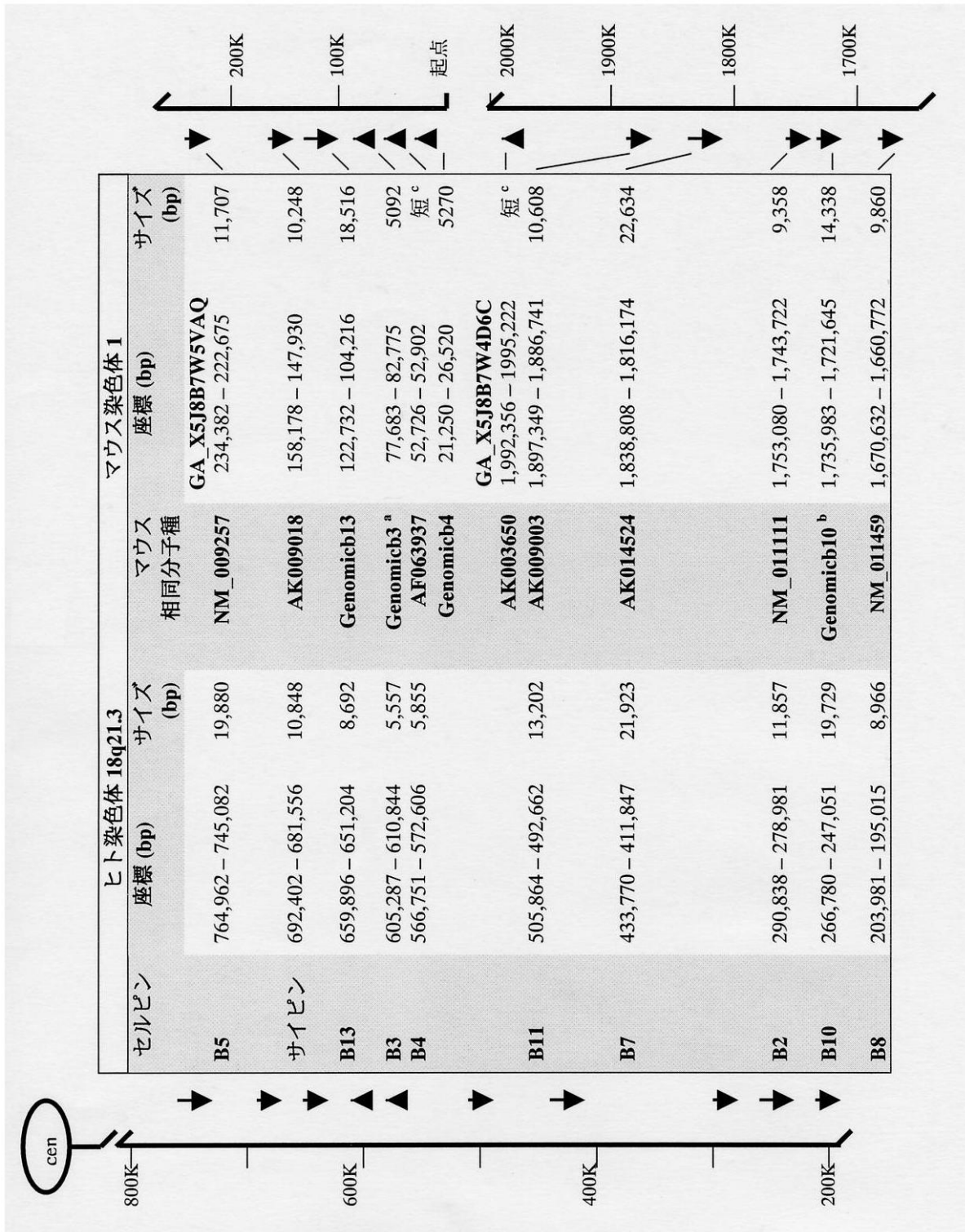
【図面の簡単な説明】

【0231】

【図1】ヒト染色体18およびマウス染色体1セルピン・クラスターのシンテニー組成。コンティグNT 010986.2上の染色体18オブ・セルピンの相対的な位置および転写方向を、線図上の矢印として示す。ヒト相同分子種と最高の相同性を示すマウスcDNAを、それぞれのゲノム骨格に対して、同様にマッピングする。ヌクレオチド座標は、表の座標欄に開始メチオニンから末端コドンまで示す。サイズ欄は、塩基対（bp）でこれらの遺伝子の長さを示す。以下のゲノム配列は、完全オープンリーディングフレームをコードしない：^a Genomic b3配列は、ORF中央に停止コドンを有する；^b エクソン7スプライシング結合部の配列が失われている；^c 短い配列：正確なマッチは、AF063937をコードする第二のエクソン、並びにAK003650のエクソン4、6、7、および8に関して存在する。

30

【図 1】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 September 2002 (19.09.2002)

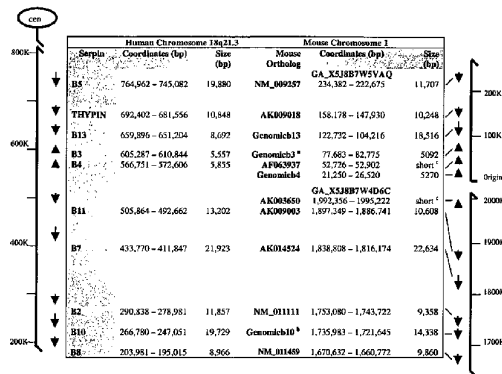
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/072769 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US02/07215
(22) International Filing Date: 8 March 2002 (08.03.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
60/274,522 8 March 2001 (08.03.2001) US
60/274,519 8 March 2001 (08.03.2001) US
(71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNEX CORPORATION [US/US]; 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).
(72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): CLARKE, Howard, R., G. [US/US]; 10823 Marine View Drive SW, Seattle, WA 98146 (US). DUBOSE, Robert, F. [US/US]; 6151 156th Place SE, Bellevue, WA 98006 (US). WILEY, Steven, R. [US/US]; 1511 11th Avenue West #6, Seattle, WA 98119 (US).
(74) Agent: SPRUNGER, Suzanne, A.; Law Department, Immunex Corporation, 51 University Street, Seattle, WA 98101 (US).
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SL, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: HUMAN SERPIN POLYPEPTIDES



(57) Abstract: This invention relates to Thypin, and other new members of the human serpin polypeptide family, methods of making Thypin polypeptides and using these polypeptides to treat various medical disorders, and to methods of screening for compounds that agonize or antagonize Thypin polypeptide activities.

WO 02/072769 A2**Published:**

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

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

WO 02/072769

PCT/US02/07215

1

5 HUMAN SERPIN POLYPEPTIDES

This application claims the benefit under 35 U.S.C. 119(e) of U.S. provisional applications Serial No. 60/274,519, filed 08 March 2001; and Serial No. 60/274,522, filed 08 March 2001; all of which are incorporated in their entirety by reference herein.

10

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to Thypin and other new members of the human serpin polypeptide family, and to methods of making and using such serpin polypeptides.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

"Serpin" is a name given to members of a group of single-chain 40-60 kDa proteins many of which are serine protease inhibitors, an activity from which the family originally derived its name (for reviews, see for example, Bird, *Results Probl Cell Differ* 24:63-89 (1998); Pemberton, *Cancer J* 10(1):1-11 (1997); Worrall et al., *Biochem Soc Trans* 27(4):746-50 (1999); and Irving et al., *Genome Res* 10:1845-64 (2000)). Serpins are conserved at the primary amino acid sequence level and also in their tertiary structure. Serpin family members generally share about 15-50% amino acid sequence identity. Three-dimensional computer generated models of the serpins are virtually superimposable. Serpins are found in vertebrates and animal viruses, plants and insects, and identified members of this superfamily number nearly 300.

25 Serpins may localize to the intracellular or extracellular space, the latter being mediated by a classical N-terminal signal sequence. A subset of the serpin family, the ovalbumin-like serpins (or "ov-serpins"), have a non-cleavable facultative signal sequence found near the N-terminus (Remold-O'Donnell, *FEBS Letters* 315:105-108 (1993)). Ov-serpins that possess this non-canonical signal sequence can demonstrate dual localization inside and outside the cell and are suspected to inhibit different intracellular and extracellular proteases. An example of a serpin with dual localization is PAI-2. Regulation of this dual localization may result in elevated plasma levels associated with various pathologies, such as SCCA in squamous cell carcinoma (Pemberton, 1997).

30 Serine proteases, which provide the targets for many of the inhibitory serpins, are involved in, and regulate, many aspects of biology including: degradation of extracellular matrix (such as elastases), vascular hemostasis (such as thrombin in coagulation, plasmin in thrombolysis), complement activation (such as complement factors), vasodilation in inflammation and hypertension (such as kallikreins), and digestion (such as trypsin). Leukocytes produce and store in vesicles many different serine proteases involved in cytotoxic responses (e.g. granzymes, chymases). Serpins also play a role in cell migration.

40 Serpin family members participate in variety of intracellular and extracellular processes, including serving as chaperones for protein folding, storage proteins, and transporting hormones.

WO 02/072769

2

PCT/US02/07215

- 5 Inhibitory serpins participate in many important biological activities, including: complement activation; fibrinolysis; coagulation; cellular differentiation; tumor suppression; and selection processes associated with tumor survival (i.e., apoptosis and cell migration). Mutations in serpins may cause a number of diseases, some of which are associated with serpin polymerization (Irving et al., 2000). Such diseases include, for example, blood clotting disorders, emphysema, cirrhosis and dementia.
- 10 Many serpins are found at relatively high levels in human plasma. Plasma serpins are variably glycosylated, though this glycosylation may not be required for activity (Potempa et al., *J Biol Chem* 269:15957 (1994)). These include α_1 antitrypsin (α_1 AT), which is involved in restructuring of connective tissue; C1 inhibitor, which controls complement activation; plasminogen activator inhibitors 1 and 2 (PAI-1 and PAI-2), which help control fibrinolysis; and antithrombin, which is involved in
- 15 regulating the coagulation cascade. Also present in blood are angiotensinogen, which when cleaved gives rise to vasopressor peptide that helps control blood pressure, as well as thyroxine binding globulin (TBG) and the corticosteroid binding globulin (CBG). Proteolytic cleavage of TBG appears to provide a mechanism for site-specific release of thyroxine (Schussler, *Thyroid* 10(2):141-49 (2000)). The serpins maspin, PAI-2 and α_1 AT, under certain circumstances are capable of polymerizing
- 20 (Pemberton, 1997). Some serpins, such as AT-III, achieve a much higher level of inhibitory activity if activated by polysulfated oligosaccharides such as heparin (Potempa et al., 1994). Other serpins shown to bind heparin cofactor II include protease nexin-1, active protein C inhibitor and PAI-1 (Potempa et al., 1994).
- The ov-serpins are characterized by their relatively high degree of homology with chicken
- 25 ovalbumin. The ov-serpins are reviewed, for example, in Worrall et al., 1999 and in Remold-O'Donnell, 1993. Ov-serpins generally have eight exons, seven introns and highly conserved intron-exon boundaries, though the ov-serpin PI-6 has only seven exons and six introns. The ov-serpins typically lack the extended N-terminal and C-terminal regions found in other serpins. Moreover, they possess an internal hydrophobic sequence near the amino terminus that allows both secretion and
- 30 intracellular retention, depending on the cell type or the state of differentiation of the cell in which the protein is expressed. Ov-serpins have a higher degree of amino acid homology with one another than with the other serpins (e.g., they are 40% to 50% homologous with each other, but only about 30% homologous with the other serpins). In addition, ov-serpins have a penultimate serine at the C-terminus, and they have nearly identical splice-junction positions. The ov-serpins are predominantly
- 35 intracellular, though some are secreted as well as being found intracellularly (e.g., maspin and PAI-2).
- Other physiological processes in which serpins have been implicated include prevention of tumor invasiveness (maspin), storage (ovalbumin) and functioning as a chaperone in protein folding (HSP47) (see, for example, Whisstock et al., *Trends Biochem Sci* 23(2):63-67 (1998); Sauk et al., *Connective Tissue Res* 37 (1-2): 105-119 (1998)). The heat shock protein HSP47, although studied
- 40 primarily for its role in collagen processing, sometimes escapes from the endoplasmic reticulum and reaches the cell surface, thus prompting Sauk et al. to propose that it could modulate cell migration during development and/or metastatic invasion of cancer cells (Sauk et al., 1998).

WO 02/072769

3

PCT/US02/07215

5 The clinical manifestations of serpin dysfunction include emphysema and cirrhosis (Whistock et al., 1998; Bird, 1998), which are associated with deficiencies in α_1 -proteinase inhibitor (also called " α_1 -antitrypsin"), which ordinarily control alveolar damage by neutrophil elastase. Accumulation of α_1 -proteinase inhibitor mutants in liver can give rise to hepatitis or cirrhosis (Bird, 1998). Defective antithrombin III may underlie recurrent thromboembolic disease, and certain

10 bleeding disorders could be related to deficient α_2 -antiplasmin activity, which results in higher levels of active plasmin thus increased fibrinolysis, while other clinical manifestations of serpin dysfunction include thrombosis, associated with antithrombin, which targets thrombin thereby inhibiting the coagulation cascade (Bird, 1998). It has been noted also that mutations in antithrombin III and α_2 -antiplasmin are associated with uncontrolled coagulopathies, and that hereditary angioneurotic edema

15 is associated with deficiencies in C1-inhibitor, which targets C1-elastase and is an enzyme involved in the complement cascade (Potempa et al., 1998; Whistock, 1998).

It has been noted that many aspects of osteoarthritis and rheumatoid arthritis involve cell invasion, that is, the ability of cells to cross anatomical barriers separating tissue compartments, and that proteases such as plasminogen activators and the matrix metalloproteinases play a role in

20 controlling the activity of invading and proliferating cells in inflamed joints (Del Rosso et al., *Clin Exp Rheumatol* 17:485-98 (1999)). Del Rosso et al. summarize evidence that urokinase plasminogen activator (uPA) plays a key role in extracellular matrix destruction and formation of lesions in arthritic joints. They suggest that pharmacologically controlling the plasminogen activating system may be a viable approach to preventing the development of bone lesions and joint ankylosis in arthritis.

25 The serpin family also includes viral proteins that play a role in viral virulence. For example the cowpox cytokine response modifier gene (CrmA) can block apoptosis induced by a variety of stimuli, and is known to inhibit several of the interleukin-1 β converting enzymes (ICE-like cysteine proteases). CrmA is considered a virulence factor for the cowpox virus. SERP1 (myxoma virus) targets uPA, tissue plasminogen activator (tPA) and plasmin, and promotes myxoma virus virulence.

30 The ov-serpins appear to be clustered within a 500 kb region telomeric to BCL2 at 18q21.3 (Silverman et al., *Tumor Biol* 19:480-87 (1998)). The two SCCA genes are less than 10 kb apart in this region and are flanked by the genes encoding PAI-2 and maspin (also called SERPINB5 or P15). Additional serpins mapping to 18q21.3 are the cytoplasmic antiproteinase 2 (CAP2, also called P18), bone marrow-associated serpin (bomapin, also called P110 or serpin B10), hurpin (also called

35 SERPINB13 OR "headpin") and megin. The order of several of these serpins is cen-maspin, hurpin, SCCA-2, SCCA-1, megin, PAI-2, bomapin and CAP2-tel. The SCCA-2 coding region has been cloned, and is disclosed in WO 97/14425. Contigs containing this gene cluster can be found at the NCBI website using the nucleotide search and entering one of the following contig numbers: AC019355; AP001404; or AC015536. Chromosome 18q is known to be associated with breakpoints

40 and loss of heterozygosity in cancers of the head and neck and other malignancies, thus suggesting that intact functioning of the serpin genes within this cluster may be disadvantageous to tumor growth (Spring et al., *Biochem Biophys Res Comm* 264:299-304 (1999)).

WO 02/072769

4

PCT/US02/07215

- 5 Some of the serpins have no discernable protease inhibitory activity, while others have been shown to inhibit serine or cysteine proteases (see, for example, Pemberton, 1997). Most of the ov-serpins inhibit serine proteases, however, SCCA-1, for example, inhibits cysteine proteases such as papain, cathepsins L, S and K, while the closely related SCCA-2 (92% amino acid sequence identity) inhibits chymotrypsin-like serine proteases such as mast cell chymase and cathepsin G. SCCA-1 is found mainly inside of cells, while the more acidic SCCA-2 is largely expressed in squamous cell carcinoma and released outside the cells (Suminami et al., *Tumor Biol* 19:488-93 (1998)). The cowpox CrmA protein also is a cysteine proteinase inhibitor. Hurpin is predicted to be an inhibitory serpin based on its hinge region homology with other serpins that possess this type of activity (Spring et al., (1999)).
- 10 The basic scaffold possessed by all serpins usually includes nine α helices and three β -pleated sheets. Serpins that inhibit proteinases do so via a reactive site loop or "RSL" of about 20 to 30 amino acids located 30 to 40 amino acids from the carboxy terminus. The RSL is exposed on the surface of the protein and is susceptible to cleavage by non-target proteases (see, for example, Potempa et al., 1994). The core structure of the serpin molecule folds into a three- β -sheet pear shape that presents the RSL at the top of the structure. The RSL contains "bait" sequences that are believed to mimic the target proteinase's substrate. The inhibitory serpins regulate the activity of specific serine proteases by mimicking the protease's substrate and covalently binding to the protease when cleaved at the RSL. Upon cleavage by the target protease, inhibitory serpins undergo a dramatic conformational change, called the "stressed-to-relaxed" transition, which is accompanied by the insertion of the remaining reactive site loop into one of the β sheets. During this transition, serpins form a stable heat-resistant complex with the target protease. The sequence of the RSL, and particular the P1 and adjacent amino acid residues, determine an inhibitory serpin's specificity for a protease. An RSL is considered a key feature of serpin family members, and this structure is presented in the exposed surface loop at the top of the protein even in serpins that are not known to inhibit any proteinases.
- 15 Serpins with inhibitory activity possess several regions important in controlling and modulating serpin conformational changes associated with attaching to a target protease. As summarized in Irving et al. (2000), these are the hinge region (the P15-P9 portion of the RSL); the breach (located at top of the A β -sheet, the point of initial insertion of the RSL into the A β -sheet); the shutter (at top of the A β -sheet, the point of initial insertion of the RSL into the A β -sheet); and the gate (including strands s3C and s4C; to insert into the A β -sheet, the RSL must pass around the β -turn linking strands s3C and s4C). Inhibitory serpins possess a high degree of conservation at many key amino acid residues located in the above regions which that are believed to be necessary for enabling the protein to undergo the stressed to relaxed transition (see, for example, Table 2 in Irving et al., 2000).
- 20 Serpins lacking protease inhibitory function may exploit their "bait" sequences to attract a proteinase that cleaves within the bait sequence to activate a biological effector. Leukocyte elastase inhibitor (LEI), for example, appears to be converted by the serine protease elastase into a
- 25
- 30
- 35
- 40

WO 02/072769

5

PCT/US02/07215

5 deoxyribonuclease that functions to degrade DNA during apoptosis (discussed in WO 99/58560). Another serpin, thyroxine binding globulin, is proteolytically cleaved to release biologically active T₄ at specific locations in the body (Schussler, 2000) and angiotensinogen present in serum is cleaved by its target proteinase to generate the biologically active angiotensin protein. Similarly, corticosteroid binding protein is cleaved by the elastase at inflammatory sites to locally release cortisol (Schussler, 10 2000).

The serpins PAI-1 and PAI-2 are involved in regulating the proteolytic breakdown of the extracellular matrix. Additionally, experiments have shown that PAI-2 protects cells against apoptosis induced by TNF α , apparently by blocking a protease, though PAI-2 does not protect against other apoptotic signals (for review, see Bird, 1998). PAI-2 also has been shown to bind to the anti-inflammatory and growth regulatory lipocortins (annexins). PAI-2 thus may be involved in regulating 15 inflammation or growth factor signaling.

Proteinase inhibitor-9 (PI-9) is an ov-serpin proposed to protect cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells from self-induced apoptosis resulting from exposure to granzyme B, an enzyme these lymphocytes produce to induce DNA degradation in target cells (Bird, 1998). PI-9 is not secreted 20 and is apparently restricted to lymphoid tissue. Another inhibitory serpin, protease nexin I (PN-I) is secreted and is a potent heparin-dependent thrombin and urokinase inhibitor (Bird, 1998). It is proposed that PN-I balances the action of thrombin on neuronal cells, thereby rescuing neural cells from apoptosis that otherwise would be induced by the action of thrombin on receptors on the surface of the neurons (Bird, 1998).

25 Serpins were originally shown to be involved in suppressing tumor invasion by directly inhibiting the matrix-degrading serine proteases uPA and plasmin produced by some tumor cells. Tumor-produced proteases are believed to facilitate a tumor's ability to metastasize, thus are targets for therapeutic intervention. Some cysteine proteases, such as the calpains, have been implicated in apoptotic pathways involved in tumor surveillance (Pemberton, 1997).

30 One serpin with demonstrated tumor-suppressing capacity is the ov-serpin maspin. Maspin is found mainly in the membrane fraction of epithelial cells (such as breast and prostate), and its expression is downregulated in mammary tumor epithelium (reviewed in Sager et al., in "Chemistry and Biology of Serpins," eds. Church et al., Plenum Press, NY, 1997, at pages 77-88). Although maspin has been shown to suppress the invasiveness of both breast and prostate tumor cells, it does not 35 appear to inhibit any proteases. Even so, if trypsin is used to cleave the maspin RSL, maspin loses its ability to inhibit tumors. Evidently, maspin interferes with tumor growth by some as-yet-unidentified mechanism that requires an intact RSL.

In some cancers, elevated plasma levels of certain serpins serve as markers of cancer progression. For example, the level of the prostate specific antigen (PSA) in complex with α 1AT is 40 used to monitor the progression of prostate cancer (Pemberton, 1997). Another serpin used as a tumor marker for prostate cancer is prostapin, which is described in WO 99/58560. The ov-serpins SCCA-1 and SCCA-2 in fact were originally identified as squamous cell carcinoma antigens, and a monoclonal

WO 02/072769

6

PCT/US02/07215

- 5 antibody with which both SCCA's react is commonly used to monitor progression of this type of tumor (Barnes et al., *Gynecol Oncol* 78:62-66 (2000)). The SCCAs are elevated in squamous cell carcinomas of cervix, lung and esophagus, and SCCA levels are used as a serological marker for the extent of disease in advanced cases of these tumors (Silverman et al., 1998; Barnes et al., 2000). Suminami et al. (1998) report that the SCCA produced in epithelial cancers is primarily SCCA-2, and propose that
- 10 SCCA-2 normally protects epithelial cells from inflammation. Elevated serum levels of SCCA have also been observed in patients with benign skin disorders with an inflammatory component. Such conditions include psoriasis and eczema (Barnes et al., 2000). SCCA-1 and SCCA-2 are elevated in psoriatic epidermis and are disclosed as psoriasis markers called "psoriastatin 1" and "psoriastatin 2" (WO 97/14425). Another related serpin, hurpin, also is overexpressed in psoriatic skin lesions and is
- 15 disclosed as a lung tumor antigen (WO 99/47674). Hurpin is expressed in normal oral mucosal tissue, skin and in cultured keratinocytes, but is underexpressed in squamous cell cancers of the oral cavity (Spring et al., 1999). Bomapin is expressed specifically in the bone marrow (Riewald and Schleef, *J Biol Chem* 270:26754-57 (1995)).

- Various serpins are expressed by many tissues in the body (see, for example, Worrall et al., 1999). Those present at high concentrations in the blood generally are synthesized in the liver. PAI-2 and LEL, for example, are expressed in monocytes. Maspin is expressed in normal mammary epithelium (Sager et al., 1997). SCCA-1 and SCCA-2 are expressed in normal and malignant squamous epithelium, particularly in the spinous and granular layers of epidermis and in the intermediate layer of the ectocervical epithelium (Suminami et al., 1998).

- 25 In order to develop more effective treatments for conditions and diseases mediated by serpins and their targets, more information is needed about unidentified members of the serpin polypeptide family.

SUMMARY OF THE INVENTION

- The present invention is based upon the discovery of new human serpin family members, including Thypin (previously referred to as 'epipin'). The Thypin gene is located within a cluster of related serpin family members at chromosome 18q21.3. Among the serpins, Thypin is most closely related to SCCA-1, SCCA-2 and hurpin, all of which are expressed in psoriatic tissue.

- The invention provides an isolated Thypin polypeptide consisting of, consisting essentially of, or more preferably, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- 35 (a) the amino acid sequences shown in SEQ ID NO:2;
- (b) fragments of the amino acid sequences of (a) comprising at least 20 contiguous amino acids;
- (c) fragments of the amino acid sequences of (a) comprising at least 30 contiguous amino acids;
- 40 (d) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) having Thypin polypeptide activity;

WO 02/072769

7

PCT/US02/07215

- 5 (e) fragments of the amino acid sequences of any of (a)-(c) comprising amino acids from 374 to 395 of SEQ ID NO:2;
- (f) amino acid sequences comprising at least 20 amino acids and sharing amino acid identity with the amino acid sequences of any of (a)-(e), wherein the percent amino acid identity is selected from the group consisting of: at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, at least 99%, and at least 99.5%;
- 10 (g) an amino acid sequence of (f), wherein a polypeptide comprising said amino acid sequence of (f) binds to an antibody that also binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence of any of (a)-(e); and
- (h) an amino acid sequence of (f) or (g) having Thypin polypeptide activity.

- 15 Preferably, such polypeptides are isolated Thypin polypeptides or isolated polypeptides that are variants of Thypin. As used herein, a "variant" is a polypeptide that differs from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 only in conservative substitutions and/or modifications such that the therapeutic, antigenic and/or protease inhibitory properties of the polypeptide are retained. In a preferred embodiment, such substitutions or modifications do not involve the Thypin RSL (amino acids 374-395 of SEQ ID NO:2) and differ from the polypeptide defined by SEQ ID NO:2 by the substitution, deletion or addition of five or fewer amino acids. Preferred Thypin variants share 95% or more amino acid sequence identity with SEQ ID NO:2.
- 20

- Other aspects of the invention are isolated nucleic acids encoding polypeptides of the invention, and isolated nucleic acids, preferably having a length of at least 15 nucleotides, that hybridize under conditions of moderate stringency to the complement of nucleic acids encoding polypeptides of the invention, such as the nucleotide sequence given in SEQ ID NO:1. In yet other embodiments, the nucleic acids hybridize under highly stringent conditions with the complement of SEQ ID NO:1. In preferred embodiments of the invention, such nucleic acids encode a polypeptide having Thypin polypeptide activity, or comprise a nucleotide sequence that shares nucleotide sequence identity with the nucleotide sequences of SEQ ID NO:1, wherein the percent nucleotide sequence identity is selected from the group consisting of: at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, at least 99%, and at least 99.5%. Such nucleic acids preferably encode Thypin, a Thypin variant, or an antigenic fragment thereof. Also encompassed are segments of SEQ ID NO:1 at least 15 nucleotides in length for use as probes for *in situ* hybridization to chromosome 18q. The invention also provides an isolated genomic nucleic acid corresponding to the nucleic acids of the invention.
- 25
- 30
- 35

- Further provided by the invention are expression vectors and recombinant host cells comprising at least one nucleic acid of the invention, and preferred recombinant host cells wherein said nucleic acid is integrated into the host cell genome. In other embodiments, the vector nucleic acid does not become integrated.
- 40

Also provided is a process for producing a polypeptide encoded by the nucleic acids of the invention, comprising culturing a recombinant host cell under conditions promoting expression of said

WO 02/072769

8

PCT/US02/07215

5 polypeptide, wherein the recombinant host cell comprises at least one nucleic acid of the invention. A preferred process provided by the invention further comprises purifying said polypeptide. In another aspect of the invention, the polypeptide produced by said process is provided.

Further aspects of the invention are isolated antibodies that bind specifically to the polypeptides of the invention, preferably monoclonal antibodies, also preferably humanized antibodies or humanized antibodies, and preferably wherein the antibody inhibits the activity of said polypeptides.

10 The invention additionally provides a method of designing an inhibitor of the polypeptides of the invention, the method comprising the steps of determining the three-dimensional structure of any such polypeptide, analyzing the three-dimensional structure for the likely binding sites of substrates, synthesizing a molecule that incorporates a predicted reactive site, and determining the polypeptide-inhibiting activity of the molecule.

15 In a further aspect of the invention, a method is provided for identifying compounds that alter Thypin polypeptide activity comprising

- (a) mixing a test compound with a polypeptide of the invention; and
- (b) determining whether the test compound alters the Thypin polypeptide activity of said

20 polypeptide.

In another aspect of the invention, a method is provided identifying compounds that inhibit the binding activity of Thypin polypeptides comprising

- (a) mixing a test compound with a polypeptide of the invention and a binding partner of said polypeptide; and
- 25 (b) determining whether the test compound inhibits the binding activity of said polypeptide.

The invention also provides a method for increasing protease inhibitory activities, comprising providing at least one compound selected from the group consisting of the polypeptides of the invention and agonists of said polypeptides; with a preferred embodiment of the method further comprising increasing said activities in a patient by administering at least one polypeptide of the invention.

Further provided by the invention is a method for decreasing protease inhibitory activity, comprising providing at least one antagonist of the polypeptides of the invention; with a preferred embodiment of the method further comprising decreasing said activities in a patient by administering at least one antagonist of the polypeptides of the invention, and with a further preferred embodiment wherein the antagonist is an antibody that inhibits the activity of any of said polypeptides.

35 The invention additionally provides a method for treating conditions and diseases mediated by Thypins and their targets, comprising administering at least one compound selected from the group consisting of the polypeptides of the invention and agonists of said polypeptides; with a preferred embodiment wherein the condition or disease mediated by Thypins or their targets is selected from the group consisting of emphysema, cirrhosis, hepatitis, blood clotting disorders (including thrombosis), tumor formation, and tumor metastasis or invasiveness.

WO 02/072769

9

PCT/US02/07215

5 In other aspects of the invention, a method is provided for treating conditions and diseases mediated by Thypins and their targets, comprising administering an antagonist of the polypeptide of the invention; with a preferred embodiment wherein the condition or disease mediated by Thypins or their targets is viral virulence.

10 A further embodiment of the invention provides a use for the polypeptides of the invention in the preparation of a medicament for treating conditions and diseases mediated by Thypins and their targets; with a preferred embodiment wherein the condition or disease mediated by Thypins or their targets is selected from the group consisting of emphysema, cirrhosis, hepatitis, blood clotting disorders, tumor formation, and tumor metastasis or invasiveness.

15 A further embodiment of the invention provides a use for the polypeptides of the invention in the preparation of a medicament for treating medical conditions associated with Thypin dysfunction.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Syntenic organization of human chromosome 18 and mouse chromosome 1 serpin clusters. The relative positions and transcriptional orientations of the chromosome 18 ov-serpins on contig NT_010986.2 are shown as arrows on the line diagram. Mouse cDNAs with highest homology to their human orthologs are similarly mapped to their respective genomic scaffold. The nucleotide coordinates are presented from the initiator methionine to the terminal codon in the coordinates column of the table. The size column presents the length of these genes in basepairs (bp). The following genomic sequences do not encode complete open reading frames: ^a Genomicb3 sequence has a stop codon in the middle of the ORF; ^b missing sequence at exon 7 splice junction; ^c short sequences: exact matches exist for the second exon encoding AF063937 and exons 4, 6, 7, and 8 of AK003650.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

30 We have identified Thypin (previously named 'epipin'), a new serpin polypeptide having structural features characteristic of this polypeptide family. A splice variant of Thypin, SERPINB12 (also called Yukopin), has been published as GenBank accession number AF411191. The amino acid sequence of a representative human Thypin polypeptide is provided in SEQ ID NO:1 and a nucleotide sequence encoding this polypeptide is provided in SEQ ID NO:2. An alignment showing the sequence similarities between Thypin and serpin polypeptides is presented in Table 2 in Example 1 below. It is apparent from amino acid sequence homology, predicted tertiary structure homology, and chromosome 18 localization that Thypin is an ov-serpin. The most closely related to Thypin from among the known serpins is SCCA-2, with which Thypin shares about 51 % amino acid sequence homology. The mouse homologue of Thypin has GenBank accession number AK009018. Mouse Thypin (AK009018) is located on mouse chromosome 1 in an ov-serpin cluster that contains known mouse ov-serpin genes for Serpinb2, Serpinb5 and Serpinb7 (see Example 7 below).

WO 02/072769

10

PCT/US02/07215

5 Thypin contains domains similar to those found in other ov-serpins (see Remold-O'Donnell, 1993). One of these is a hydrophobic region located near the amino terminus. This hydrophobic region, though not cleaved, serves as a signal sequence for serpins that enter the extracellular space. Thypin possesses such a hydrophobic region, which was identified as a signal sequence according to the method of Heijne (*Nucleic Acids Res* 14(11):4683-4690 (1986)). The predicted Thypin signal sequence aligns well with known ov-serpin signal sequences, and extends from amino acids 28 to 42 in SEQ ID NO:2. Relative to most of the other ov-serpins, Thypin has an insertion located at approximately amino acids 61 to 107 of SEQ ID NO:2. This region is identified as the interhelical variable loop region because it occurs between two conserved helices (see Remold-O'Donnell, 1993). In other serpins, the interhelical variable loop is exceedingly variable in length and amino acid composition. In Thypin, this region is unusually large due to the insertion, but this circumstance does not interfere with the canonical serpin fold. The Thypin insertion is located between two conserved ov-serpin helices (helix C and helix D). PAI-2 also has a large insertion at this same location. The insertion at amino acids 61 to 107 of SEQ ID NO:2 is also present in SERPINB12/Yukopin, except for twenty amino acids specific to Thypin at amino acids 82 through 101 of SEQ ID NO:2, which may be a transglutamination site. The AK009018 murine Thypin polypeptide also includes the Thypin-specific potential transglutamination residues. The discrepancy between Thypin and Yukopin results from the use of different 5' splice sites in intron C; the 3' splice site is identical. The Thypin 5' splice site for intron C is located following nucleotide 303 of SEQ ID NO:1; Yukopin uses a 5' splice site 60 nucleotides upstream within Exon 2 (between nucleotides 243 and 244 of SEQ ID NO:1) with an atypical exon-side ultimate adenine found in 8% of vertebrate splice sites (Padgett *et al.*, 1986, *Ann Rev Biochem* 55: 1119-1150): AAA/gtgcgtg (nucleotides 241 through 249 of SEQ ID NO:1). There is precedent for alternative splicing in the ov-serpins as a SERPINB13 variant has been described with an insertion in the C-D interhelical loop (Spring *et al.*, 1999, *Biochem Biophys Res Comm* 264: 299-304). Intron/exon splice site phasing is conserved in ov-serpins and has been used to predict evolutionary relatedness of members of the serpin superfamily. Ov-serpins have six introns (A, B, D, E, F, and G) that occur in conserved locations. Intron C, found in a subset of the ov-serpins, is located in the C-D interhelical loop and the exact location is not conserved between serpins. Thypin possesses a high proportion of glutamines in the C-D interhelical loop (5/47 or 10.6% as compared to 6.2% expected (McCaldon and Argos, 1988, *Proteins* 4: 99-122; murine Thypin has 6/45 or 13.3% glutamines in the C-D interhelical loop). The deletion in Yukopin eliminates three of the five glutamines present in human Thypin. It is interesting to speculate that this difference between Thypin and Yukopin may result in a functional difference in the ability to be crosslinked by transglutamination.

Moving from the hypervariable region towards the COOH-terminus, the ov-serpins possess a region within which there is a relatively high degree of conservation. In Thypin, this region extends from approximately amino acid 108 to amino acid 373 of SEQ ID NO:2. This relatively conserved region is referred to herein as the "structural core" region. The serpin RSL is located further towards the COOH-terminus past the structural core region. Based on amino acid homologies, the RSL in

WO 02/072769

11

PCT/US02/07215

5 Thypin is approximately 22 amino acids long, and extends from amino acids 374 to 395 in SEQ ID NO:2. According to the naming convention for proteolytic cleavage sites of known serpins, amino acid residue 374 is the P17 amino acid and amino acid 395 is P5'. These designations place the scissile bond between the arginine at position 390 (P1) and the serine at position 391 (P1'). Cleavage by the target protease is expected to occur between P1 and P1'. Following the RSL, serpin family members
 10 contain a highly conserved serpin signature motif. The Thypin amino acids between residues 398-408 of SEQ ID NO:2 precisely match this serpin signature motif. Therefore, the foregoing structural features indicate that the Thypin polypeptide has an overall primary structure consistent with other ov-serpins.

The skilled artisan will recognize that the boundaries of the regions of Thypin polypeptides described above are approximate and that the precise boundaries of such domains can also differ from member to member within the serpin polypeptide family.

To further establish the classification of Thypin as a member of the serpin structural family, the Thypin sequence was submitted to GeneFold (Tripos, Inc., St. Louis, MO; Berman et al., *Nucleic Acids Res* 28:235-242 (2000)) which is a protein threading program that overlays a query protein sequence onto structural representatives of the Protein Data Bank (PDB) (Jaroszewski et al., *Prot Sci* 7:1431-40 (1998)). Serpin family members, despite their diversity, are characterized by a highly characteristic three-dimensional structure that can be predicted from their primary amino acid sequences by using protein-threading algorithms such as GeneFold. To use GeneFold to classify new members of a protein family, the new protein sequence is entered into the program, then is assigned a
 25 probability score that reflects how well it folds onto previously known protein structures ("template" structures) that are present in the GeneFold database. For scoring, GeneFold relies on primary amino acid sequence similarity, burial patterns of residues, local interactions and secondary structure comparisons. In using GeneFold, the amino acid sequence is folded (or threaded) onto all of the template structures in a preexisting database of protein folds, which includes the solved structures for several serpins. For each comparison, the program first determines the optimal alignment, and then calculates the probability (P-value) that this degree of alignment occurred by chance. The inverse of the P-value is determined for the query sequence threaded onto each template structure, and this inverse P-value is reported as a score. Three different scores are actually calculated for each hit and are reported in three columns. These three scores are based on (i) sequence only; (ii) sequence plus local
 35 conformation preferences plus burial terms; and (iii) sequence plus local conformation preferences plus burial terms plus secondary structure. All scores above the designated cutoff are returned, along with the associated template identifier for each column. These scores therefore reflect the degree to which the new protein matches the various reference structures. The scores thus are useful for assigning a new protein to membership in a known family of proteins. The highest possible score using GeneFold is 999.999. When threaded into the GeneFold program, the ov-serpins LEI (SwissProt No. P30740), PAI-2 (GenBank No. XP_008746), SERPINB10 (bomapin) (GenBank No. NP_005015), SCCA-1 (SwissProt No. P29508), SCCA-2 (SwissProt No. P48594) and prostapin (GeneSeq No. Y15156) all

WO 02/072769

12

PCT/US02/07215

5 had scores of 999.99 in all three columns relative to the top five hits. In each instance, all of the top five hits were serpins, thus illustrating the high degree of structural conservation among this group of proteins.

After threading against all structures in the GeneFold database, Thypin scored 999.99 in all three types of score (i.e., all three columns) with five different known serpins in the GeneFold database. The PDB hits in the order listed by GeneFold are: IovaA (Ovalbumin), IhleA (Horse Leukocyte Elastase Inhibitor), 2antI (Antithrombin), Iatu (alpha-1-Antitrypsin), and Ias4A (Antichymotrypsin). The GeneFold results give a clear indication that Thypin is a serpin. However, extracting the alignment against IovaA shows a large insertion present in the Thypin interhelical variable loop region (amino acids 80 to 111 of SEQ ID NO:2). The insertion was mapped onto the structure of IovaA using the

15 Molecular Operating Environment (MOE) from the Chemical Computing Group (1010 Sherbrooke St W, Ste 910, Montreal, Quebec, Canada H3A 2R7) and is found on a loop that is isolated from secondary structure elements. A simple loop extension is all that is required to fold Thypin as a serpin.

When Thypin variants according to the invention, such as allelic variants with normal bioactivity or mutants with altered bioactivity, are analyzed using GeneFold, the top five hits obtained will be serpins, and the score for the top five hits will be 999.999. A score of 999.999 will be obtained for these five hits using any of the three types of score reported by GeneFold, i.e., sequence only, sequence plus local conformation preferences plus burial terms, or sequence plus local conformation preferences plus burial terms plus secondary structure. Such Thypin variants are distinguished from other serpins by virtue of containing particular amino acid sequences that differentiate Thypin from

25 other known serpins. Particular amino acid regions that differentiate Thypin from other serpins include but are not limited to the Thypin insertion loop from amino acids 61 to 107 of SEQ ID NO:2; the Thypin core region from amino acid 108 to 373 of SEQ ID NO:2; and the Thypin RSL from amino acid 374 to 395 of SEQ ID NO:2. Thypin variants typically will contain about 425 amino acids, but such variants may contain deletions or insertions of around 5 amino acids while still retaining the bioactivity associated with the Thypin polypeptide represented in SEQ ID NO:2.

A partial human cDNA clone (AA242969) in the GenBank dbEST database contains an open reading frame that predicts a protein having 95% identity to amino acids 69-250 of the Thypin polypeptide shown in SEQ ID NO:2. This EST-encoded polypeptide thus encompasses the above-discussed Thypin insertion (amino acids 61-107 of SEQ ID NO:2), and partially encompasses the

35 Thypin structural core (amino acids 108-373 of SEQ ID NO:2). This EST protein differs from Thypin at eight amino acid residues, which correspond in position to amino acids 109, 115, 118, 126, 127, 216, 246 and 248 of SEQ ID NO:2. The amino acids present in the EST at those locations are, respectively, threonine, asparagine, lysine, phenylalanine, arginine, isoleucine, proline and phenylalanine, whereas in Thypin the corresponding amino acids, respectively, are serine, tyrosine, glutamine, isoleucine, lysine, lysine, glutamine and tyrosine. One embodiment of the invention includes Thypin variants having about 95% or greater amino acid sequence identity with SEQ ID NO:2, and further possessing at least one of the following: a serine at residue 109; a tyrosine at residue 115; a glutamine at residue

40

WO 02/072769

13

PCT/US02/07215

5 118; an isoleucine at residue 126; a lysine at residue 216 or 246; a glutamine at residue 246; or a tyrosine at residue 248. Optimally, these Thypin variants will possess protease inhibitory activity. It should be noted that the polypeptide predicted by EST AA242969 lacks an RSL, thus cannot fold into a serpin structure nor can it exhibit the protease inhibitory activity of Thypin.

10 Nucleic acid sequence analysis adds further support for the conclusion that Thypin is an ov-serpin. The Thypin gene has been localized to chromosome 18 on the NCBI human chromosomal contigs AC019355, AP001404 and AC015536. These contigs contain genomic sequence for both Thypin and hurpin, thus indicating their linkage. Radiation hybrid mapping of hurpin localizes this gene to chromosome 18q21.3/18q22, juxtaposed to a cluster of ov-serpins (Spring et al., 1999). Analysis of the genomic sequence of Thypin shows that its intron splice site junctions match conserved
15 exon-intron borders of ov-serpin family members, a feature that distinguishes them from other members of the serpin superfamily (Remold-O'Donnell, 1993).

Serpins that inhibit proteases tend to be specific for one or a few proteases. Inhibitory serpins form a 1:1 stoichiometric, heat and denaturation resistant complex with their target protease. The RSL is an important structural determinant of the inhibitory serpins. The sequence of the peptide stalk
20 leading from the A sheet to the commencement of the helix, known as the hinge region (P15-P9), is highly conserved in inhibitory serpins, and mutations in this region can result in loss of inhibitory activity (Huber and Carrell, *Biochemistry* 28:8951 (1989); Potempa et al., 1994). Within the hinge region, P12-P9 shows a dominance of residues with small side chains, which usually are alanines or glycines (Stein et al., *Nature* 347: 99-102 (1990)). Stein et al. proposes that this alanine-rich region
25 contributes to the flexibility of the stalk, and that mobility of the stalk is necessary for inhibitory action. The hinge region of Thypin (corresponding to amino acids 376-382 of SEQ ID NO:2) matches the consensus for the 40 inhibitory serpins analyzed by Potempa et al. (Potempa et al., 1994), including four consecutive alanines (amino acids 379-382 of SEQ ID NO:2) in the alanine-rich stalk, thus indicating that Thypin is a member of the inhibitory serpin subfamily.

30 It is possible to predict what class of protease is inhibited by a serpin based on the amino acid in the P1 position of the RSL. Thypin has an arginine at P1, thus indicating that it is likely to inhibit one or more arginine-cleaving proteases. Consistent with this prediction, recombinant Yukopin is an inhibitor of trypsin-like serine proteases (Askew et al., 2001, *J Biol Chem* 276: 49320-49330). It is expected that Thypin would have the same *in vitro* activity as Yukopin since the C-D interhelical loop
35 does not appear to have a role in protease inhibitory activity. (An interesting difference between the human and mouse Thypin homologs is that the mouse RSL has a P1 lysine instead of arginine.) Many arginine-cleaving proteases are present in human serum and tissues. Inhibitory serpins with an arginine at P1 include PAI-1, which targets uPA and tPA, PAI-2, which targets uPA and tPA, anti-thrombin, which targets the serine protease thrombin, and C1-inhibitor, which targets C1-esterase (see Whisstock et al., 1998). Serine proteases with P1 arginine specificity that are potential therapeutic targets for
40 inactivation by Thypin include but are not limited to: trypsin, tryptase, kallikrein, tonin, thrombin, protein C, uPA, tPA, plasmin, coagulation factors VIIa, IXa, Xa, XIa, and XIIa, complement factors 1,

WO 02/072769

14

PCT/US02/07215

- 5 B and D, complement components C1 and C2, granzymes A and K, hepsin, prostatic, follipin, acrosin, and hepatocyte growth factor activator.

PCR amplification from tissue-specific cDNA libraries was performed to detect Thypin cDNA sequences. The results of these experiments showed that Thypin transcripts are expressed in a wide variety of fetal cells and adult cells, including the following: bronchial epithelium; prostate epithelium; breast epithelium; and small airway epithelium. In addition, Thypin is expressed in the following epithelial tissues: prostate; testis; thymus; tonsil; skin; keratinocytes; cervix; fetal small intestine; and esophagus. In addition, Thypin is expressed in the following carcinoma and transformed cell lines: lung epithelial carcinoma (A549); B cell lymphoma (Akata, Nalm6, Namalwa); cancer cells of monocytic origin (U937, Thp-1, AML5); and tumor xenografts (colon, pancreas, prostate). Thypin expression also was observed in miscellaneous tumors originating from lung and esophagus. The primers used to amplify Thypin sequences should amplify Yukopin cDNA as well, but in our PCR examination of greater than 100 different tissue cDNAs we have not identified a size polymorphism consistent with a 20-amino acid (60-nucleotide) difference. This could result from limited agarose gel resolution or lack of the Yukopin mRNA in the tissues we examined. We sequenced nine PCR products from different tissues through the interhelical loop and identified only the Thypin sequence described herein.

The SCCAs also are expressed in normal squamous epithelial tissue (e.g., tongue, tonsil, esophagus, Hassall's corpuscles of the thymus, and skin), which is similar to the expression pattern observed here for Thypin. Also, the SCCAs are elevated in squamous cell carcinomas of cervix, lung and esophagus. Thypin similarly is expressed also in carcinoma tissue (i.e. G1112 colon adenocarcinoma). Both SCCA1 and SCCA2 are elevated in psoriatic epidermis (see WO 97/14425). Another related serpin, hurpin, also is overexpressed in psoriatic skin lesions and is described as a lung tumor antigen (WO 99/47674).

The above-described pattern of Thypin expression indicates that normal expression of Thypin, like the related SCCA-2, is largely confined to tissues rich in squamous epithelium, thus suggesting that Thypin can serve as a marker for epithelial tissues, such as, for example, in providing epithelium-specific antibodies for tagging epithelial cells in histological preparations, or for determining whether cells of epithelial origin are present in a tumor biopsy.

In some cancers, a serpin that normally is intracellular will assume a bitopological distribution. An example of such a serpin is SCCA-2, which is present in high amounts in the extracellular compartments only in conjunction with a pathological condition such as squamous cell carcinoma. Similarly, redistribution of Thypin from a primarily intracellular location to bitopological intracellular/extracellular location may provide an indicator for particular types of cancer. Bird (1998) also notes that while the intracellular form of PAI-2 is most abundant form, levels of the secreted form increase during pregnancy, inflammation and malignancy.

Like SCCA-1 and SCCA-2, Thypin may be useful as a psoriasis marker, or like maspin, Thypin may be useful as a tumor suppressor. In addition, modulation of Thypin expression or activity

WO 02/072769

15

PCT/US02/07215

5 may find use in regulating vascular hemostasis, in treating emphysema or cystic fibrosis or in preventing complications of coronary bypass surgery.

In epithelial cell lines and the Thp-1 cell line, Thypin expression appears to become elevated in response to induction with the tumor promoter phorbol myristic acid (PMA) or by infection with *Yersinia enterocolitica*. The latter finding indicates that detecting increased levels of Thypin transcripts or
 10 detecting increased levels of Thypin protein in infected tissues can provide a rapid diagnostic for *Yersinia* infection thus assisting in control of disease caused by *Yersinia spp.* Such diseases include plague and diarrhea. Also, detection of increased Thypin expression can serve as a diagnostic to determine if tissues have been exposed to tumor promoters such as PMA.

In addition to the above, protease-Thypin complexes may serve as a chemoattractant for
 15 neutrophils and monocytes.

As described in Example 5 below, the Thypin gene has been mapped to human chromosome 18q21.3. Thus, the Thypin nucleotide sequences set forth in SEQ ID NO:1 provide a useful tool for tagging chromosome 18q21.3 in histological preparations of human chromosomes. Such procedures using Thypin probes can serve as a diagnostic tool for analyzing cells in a tumor biopsy to determine
 20 whether there has been a breakpoint or loss of heterozygosity at this location in chromosome 18. Such knowledge could be useful for predicting the patient's response to various treatment options. Procedures for *in situ* hybridization to chromosomes are known in the art and typically employ labeled probes of sufficient length to form stable nucleic acid duplexes with the target sequences present in chromosomes that have been fixed to a slide and that have been treated to denature the chromosomal
 25 DNA. Suitable probes for this purpose correspond to nucleotide sequences of SEQ ID NO:1, and are at least 15 nucleotides in length, and more preferably are 30 or more nucleotides in length.

Typical biological activities or functions associated with Thypin polypeptides include the inhibition of proteases. Thypin is likely to inhibit one or more proteases found in the serum, extracellular matrix or intracellular space. Protease inhibitory activity is associated with the RSL
 30 domain of Thypin polypeptides (amino acids 376-395 of SEQ ID NO:2). Thus, for uses requiring RSL activity, preferred Thypin polypeptides include those having the Thypin RSL domain and exhibiting the ability to inhibit proteases present in serum or extracellular matrix.

Preferred Thypin polypeptides comprise the Thypin RSL and retains specific protease inhibitory capacity of the Thypin protein whose amino acid sequence is shown in SEQ ID NO:2. The
 35 protease inhibitory activity of Thypin polypeptides may be determined, for example, in an assay that measures release of polypeptide fragments resulting from the incubation of intact extracellular matrix proteins or intact serum proteins with purified recombinant Thypin. Alternatively, Thypin protease inhibitory activity may be detected by incubating a labeled purified recombinant serpin having the Thypin RSL with serum proteins or extracellular matrix proteins, boiling the mixture in the presence of
 40 sodium dodecyl sulfate, then analyzing the product to determine whether the Thypin has undergone a change consistent with the Thypin having formed a stable heat-resistant complex with a target protease. For example, the boiled mixture can be analyzed by using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, as

WO 02/072769

16

PCT/US02/07215

5 described in Riewald and Schleef, 1995. The Thypin-protease complexes thus identified can be further analyzed to determine the identity of the protease. As an alternative to using mixtures of serum proteins or extracellular matrix proteins, the assays may employ specific proteases known to form complexes with closely-related serpins. Such proteases include but are not limited to: trypsin, trypsin, kallikrein, tonin, thrombin, protein C, uPA, tPA, plasmin, coagulation factors VIIa, IXa, Xa, Xla, and XIIa, complement factors I, B and D, complement components C1 and C2, granzymes A and K, hepsin, prostasin, follipain, acrosin, and hepatocyte growth factor activator

10 To exhibit protease inhibitory activity, the Thypin RSL must be present in a serpin molecule having the serpin tertiary structure that ensures presentation of the RSL in the loop at the top of the structure. Thus, to exhibit activity, the Thypin RSL must be present in an intact Thypin molecule, or
15 alternatively, a different serpin molecule can be engineered to substitute the Thypin RSL for its native RSL.

Thus, for uses requiring protease inhibitory activity, preferred Thypin polypeptides include those having the RSL domain (amino acids 374-395 of SEQ ID NO:2) and capable of forming heat-resistant complexes with serum proteins or extracellular matrix proteins. The protease inhibitory
20 activity of Thypin polypeptides may be determined, for example, in an assay that measures Thypin-protease complexes, or in an assay that measures the ability of the target protease to cleave the protein that is its natural target. The degree to which individual members of the Thypin polypeptide family and fragments and other derivatives of these polypeptides exhibit these activities can be determined by standard assay methods, particularly assays such as chromatography and polyacrylamide gel
25 electrophoresis.

Another aspect of the biological activity of Thypin polypeptides is the ability of members of this polypeptide family to bind particular binding partners such as Thypin-specific antibodies, target proteases or any other biological molecule that normally interacts with Thypin. The term "binding partner," as used herein, includes target proteases, ligands, receptors, substrates, antibodies, and any
30 other molecule that interacts with a Thypin polypeptide through contact or proximity between particular portions of the binding partner and the Thypin polypeptide. Because the RSL domain of Thypin polypeptides determines the Thypin binding specificity to a binding partner(s), the RSL domain when expressed as a separate fragment from the rest of a Thypin polypeptide, or as a soluble polypeptide, fused for example to an immunoglobulin Fc domain, may be capable of disrupting the
35 binding of Thypin polypeptides to their binding partners thus inhibiting the biological activities mediated via binding of Thypin polypeptides to its natural target(s). Suitable assays to detect or measure the binding between Thypin polypeptides and their binding partners include the chromatographic assays described above.

Serpin polypeptides are involved in a variety of diseases or conditions. Such diseases may
40 involve over expression of the serpin in question, or expression of an aberrant version of this serpin. Blocking or inhibiting the interactions between members of the Thypin polypeptide family and their target proteases or other binding partners, and/or other interacting polypeptides is an aspect of the

WO 02/072769

17

PCT/US02/07215

5 invention and provides methods for treating or ameliorating these diseases and conditions through the use of inhibitors of Thypin polypeptide activity. For conditions involving too little Thypin polypeptide activity, methods of treating or ameliorating these conditions comprise increasing the amount or activity of Thypin polypeptides by providing isolated Thypin polypeptides or active fragments, or by providing compounds (agonists) that activate endogenous or exogenous Thypin polypeptides.

10 Preferred methods of administering Thypin polypeptides to organisms in need of treatment, such as mammals or most preferably humans, include local or systemic administration, injection, slow-release implants, aerosol inhalation, and may involve polyethylene glycol derivatives of Thypin.

Additional uses for Thypin polypeptides include use as diagnostic reagents for cancers characterized by locally elevated Thypin expression or by elevated serum levels of Thypin.

15 **Thypin Polypeptides**

An Thypin polypeptide is a polypeptide that shares a sufficient degree of amino acid identity or similarity to the Thypin polypeptide of SEQ ID NO:2 to be identified by those of skill in the art as a polypeptide likely to share particular structural domains and/or to have biological activities in common with the Thypin polypeptide of SEQ ID NO:2 and/or to bind to antibodies that also specifically bind to

20 other Thypin polypeptides. Thypin polypeptides may be isolated from naturally occurring sources, or have the same structure as naturally occurring Thypin polypeptides, or may be produced to have structures that differ from naturally occurring Thypin polypeptides. Polypeptides derived from any Thypin polypeptide by any type of alteration (for example, but not limited to, insertions, deletions, or substitutions of amino acids; changes in the state of glycosylation of the polypeptide; refolding or isomerization to change its three-dimensional structure or self-association state; and changes to its

25 association with other polypeptides or molecules) are also Thypin polypeptides. Therefore, the polypeptides provided by the invention include polypeptides characterized by amino acid sequences similar to those of the Thypin polypeptides described herein, but into which modifications are naturally provided or deliberately engineered. A polypeptide that shares biological activities in common with

30 Thypin polypeptides is a polypeptide having Thypin polypeptide activity.

The present invention provides both full-length and mature forms of Thypin polypeptides. Full-length polypeptides are those having the complete primary amino acid sequence of the polypeptide as initially translated. The amino acid sequences of full-length polypeptides can be obtained, for example, by translation of the complete open reading frame ("ORF") of a cDNA molecule. Several

35 full-length polypeptides may be encoded by a single genetic locus if multiple mRNA forms are produced from that locus by alternative splicing or by the use of multiple translation initiation sites. The "mature form" of a polypeptide refers to a polypeptide that has undergone post-translational processing steps such as cleavage of the signal sequence or proteolytic cleavage to remove a prodomain. Multiple mature forms of a particular full-length polypeptide may be produced, for

40 example by cleavage of the signal sequence at multiple sites, or by differential regulation of proteases that cleave the polypeptide. The mature form(s) of such polypeptide may be obtained by expression, in a suitable mammalian cell or other host cell, of a nucleic acid molecule that encodes the full-length

WO 02/072769

18

PCT/US02/07215

5 polypeptide. The sequence of the mature form of the polypeptide may also be determinable from the amino acid sequence of the full-length form, through identification of signal sequences or protease cleavage sites.

10 The Thypin polypeptides of the invention also include those that result from post-transcriptional or post-translational processing events such as alternate mRNA processing which can yield a truncated but biologically active polypeptide, for example, a naturally occurring soluble form of the polypeptide. Also encompassed within the invention are variations attributable to proteolysis such as differences in the N- or C-termini upon expression in different types of host cells, due to proteolytic removal of one or more terminal amino acids from the polypeptide (generally from 1-5 terminal amino acids).

15 The invention further includes Thypin polypeptides with or without associated native-pattern glycosylation. Polypeptides expressed in yeast or mammalian expression systems (e.g., COS-1 or CHO cells) can be similar to or significantly different from a native polypeptide in molecular weight and glycosylation pattern, depending upon the choice of expression system. Expression of polypeptides of the invention in bacterial expression systems, such as *E. coli*, provides non-glycosylated molecules. Further, a given preparation can include multiple differentially glycosylated species of the polypeptide. Glycosyl groups can be removed through conventional methods, in particular those utilizing glycopeptidase. In general, glycosylated polypeptides of the invention can be incubated with a molar excess of glycopeptidase (Boehringer Mannheim).

25 Species homologues of Thypin polypeptides and of nucleic acids encoding them are also provided by the present invention. As used herein, a "species homologue" is a polypeptide or nucleic acid with a different species of origin from that of a given polypeptide or nucleic acid, but with significant sequence similarity to the given polypeptide or nucleic acid, as determined by those of skill in the art. Species homologues may be isolated and identified by making suitable probes or primers from polynucleotides encoding the amino acid sequences provided herein and screening a suitable nucleic acid source from the desired species. The invention also encompasses allelic variants of Thypin polypeptides and nucleic acids encoding them; that is, naturally-occurring alternative forms of such polypeptides and nucleic acids in which differences in amino acid or nucleotide sequence are attributable to genetic polymorphism (allelic variation among individuals within a population).

35 Fragments of the Thypin polypeptides of the present invention are encompassed by the present invention and may be in linear form or cyclized using known methods, for example, as described in H. U. Saragovi, et al., *Bio/Technology* 10, 773-778 (1992) and in R. S. McDowell, et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114 9245-9253 (1992). Polypeptides and polypeptide fragments of the present invention, and nucleic acids encoding them, include polypeptides and nucleic acids with amino acid or nucleotide sequence lengths that are at least 25% (more preferably at least 50%, or at least 60%, or at least 70%, and most preferably at least 80%) of the length of a Thypin polypeptide and have at least 60% sequence identity (more preferably at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with that Thypin polypeptide

WO 02/072769

19

PCT/US02/07215

5 or encoding nucleic acid, where sequence identity is determined by comparing the amino acid sequences of the polypeptides when aligned so as to maximize overlap and identity while minimizing sequence gaps. Also included in the present invention are polypeptides and polypeptide fragments, and nucleic acids encoding them, that contain or encode a segment preferably comprising at least 8, or at least 10, or preferably at least 15, or more preferably at least 20, or still more preferably at least 30, or most preferably at least 40 contiguous amino acids. Such polypeptides and polypeptide fragments may also contain a segment that shares at least 70% sequence identity (more preferably at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with any such segment of any Thypin polypeptide, where sequence identity is determined by comparing the amino acid sequences of the polypeptides when aligned so as to maximize overlap and identity while minimizing sequence gaps. The percent identity can be determined by visual inspection and mathematical calculation. Alternatively, the percent identity of two amino acid or two nucleic acid sequences can be determined by comparing sequence information using the GAP computer program, version 6.0 described by Devereux et al. (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) and available from the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). The preferred default parameters for the GAP program include: (1) a unary comparison matrix (containing a value of 1 for identities and 0 for non-identities) for nucleotides, and the weighted comparison matrix of Gribskov and Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, as described by Schwartz and Dayhoff, eds., *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) a penalty of 3.0 for each gap and an additional 0.10 penalty for each symbol in each gap; and (3) no penalty for end gaps. Other programs used by those skilled in the art of sequence comparison may also be used, such as, for example, the BLASTN program version 2.0.9, available for use via the National Library of Medicine website, or the UW-BLAST 2.0 algorithm, using standard default parameter settings described at the blast-wustl website. In addition, the BLAST algorithm uses the BLOSUM62 amino acid scoring matrix, and optional parameters that may be used are as follows: (A) inclusion of a filter to mask segments of the query sequence that have low compositional complexity (as determined by the SEG program of Wootton & Federhen (Computers and Chemistry, 1993); also see Wootton JC and Federhen S, 1996, Analysis of compositionally biased regions in sequence databases, *Methods Enzymol.* 266: 554-71) or segments consisting of short-periodicity internal repeats (as determined by the XNU program of Claverie & States (Computers and Chemistry, 1993)), and (B) a statistical significance threshold for reporting matches against database sequences, or E-score (the expected probability of matches being found merely by chance, according to the stochastic model of Karlin and Altschul (1990); if the statistical significance ascribed to a match is greater than this E-score threshold, the match will not be reported.); preferred E-score threshold values are 0.5, or in order of increasing preference, 0.25, 0.1, 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001, 1e-5, 1e-10, 1e-15, 1e-20, 1e-25, 1e-30, 1e-40, 1e-50, 1e-75, or 1e-100.

The present invention also provides for soluble forms of Thypin polypeptides comprising certain fragments or domains of these polypeptides. Soluble polypeptides are Thypin polypeptides that

WO 02/072769

20

PCT/US02/07215

- 5 are capable of being secreted from the cells in which they are expressed. Soluble Thypin polypeptides also include those polypeptides which include the hydrophobic signal sequence found at amino acids 28 to 42 of SEQ ID NO:2, provided that the soluble Thypin polypeptide is capable of being secreted from a cell, and preferably retains Thypin polypeptide activity. Alternatively, a signal sequence capable of directing secretion may be fused to Thypin using recombinant gene expression technology.
- 10 A secreted soluble Thypin polypeptide may be identified by separating intact cells which express the desired polypeptide from the culture medium, e.g., by centrifugation, and assaying the medium (supernatant) for the presence of the desired polypeptide. The presence of the desired polypeptide in the medium indicates that the polypeptide was secreted from the cells and thus is a soluble form of the polypeptide. The use of soluble forms of Thypin polypeptides is advantageous for many applications.
- 15 Purification of the polypeptides from recombinant host cells is facilitated, since the soluble polypeptides are secreted from the cells. Moreover, soluble polypeptides are generally more suitable than intracellular forms for parenteral administration and for many enzymatic procedures.
- Further modifications in the peptide or DNA sequences can be made by those skilled in the art using known techniques. Modifications of interest in the polypeptide sequences may include the
- 20 alteration, substitution, replacement, insertion or deletion of a selected amino acid. For example, one or more of the cysteine residues may be deleted or replaced with another amino acid to alter the conformation of the molecule, an alteration which may involve preventing formation of incorrect intramolecular disulfide bridges upon folding or renaturation. Techniques for such alteration, substitution, replacement, insertion or deletion are well known to those skilled in the art (see, e.g., U.S.
- 25 Pat. No. 4,518,584). As another example, N-glycosylation sites in the polypeptide can be modified to preclude glycosylation, allowing expression of a reduced carbohydrate analog in mammalian and yeast expression systems. N-glycosylation sites in eukaryotic polypeptides are characterized by an amino acid triplet Asn-X-Y, wherein X is any amino acid except Pro and Y is Ser or Thr. Appropriate substitutions, additions, or deletions to the nucleotide sequence encoding these triplets will result in
- 30 prevention of attachment of carbohydrate residues at the Asn side chain. Alteration of a single nucleotide, chosen so that Asn is replaced by a different amino acid, for example, is sufficient to inactivate an N-glycosylation site. Alternatively, the Ser or Thr can be replaced with another amino acid, such as Ala. Known procedures for inactivating N-glycosylation sites in polypeptides include those described in U.S. Patent 5,071,972 and EP 276,846. Additional variants within the scope of the
- 35 invention include polypeptides that can be modified to create derivatives thereof by forming covalent or aggregative conjugates with other chemical moieties, such as glycosyl groups, lipids, phosphate, acetyl groups and the like. Covalent derivatives can be prepared by linking the chemical moieties to functional groups on amino acid side chains or at the N-terminus or C-terminus of a polypeptide. Conjugates comprising diagnostic (detectable) or therapeutic agents attached thereto are contemplated
- 40 herein. Preferably, such alteration, substitution, replacement, insertion or deletion retains the desired activity of the polypeptide or a substantial equivalent thereof. One example is a variant that binds with

WO 02/072769

21

PCT/US02/07215

5 essentially the same binding affinity as does the native form. Binding affinity can be measured by conventional procedures, e.g., as described in U.S. Patent No. 5,512,457 and as set forth herein.

Useful derivatives of Thypin include fusion polypeptides that comprise peptides that are added to facilitate purification and identification of recombinantly expressed Thypin. Such peptide tags include, for example, poly-His or the antigenic identification peptides described in U.S. Patent No. 5,011,912 and in Hopp et al., *BioTechnology* 6:1204, 1988. One such peptide is the FLAG[®] peptide, 10 which is highly antigenic and provides an epitope reversibly bound by a specific monoclonal antibody, enabling rapid assay and facile purification of expressed recombinant polypeptide. A murine hybridoma designated 4E11 produces a monoclonal antibody that binds the FLAG[®] peptide in the presence of certain divalent metal cations, as described in U.S. Patent 5,011,912. The 4E11 hybridoma 15 cell line has been deposited with the American Type Culture Collection under accession no. HB 9259. Monoclonal antibodies that bind the FLAG[®] peptide are available from Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

Nucleic Acids Encoding Thypin Polypeptides

20 Encompassed within the invention are nucleic acids encoding Thypin polypeptides. These nucleic acids can be identified in several ways, including isolation of genomic or cDNA molecules from a suitable source. Nucleotide sequences corresponding to the amino acid sequences described herein, to be used as probes or primers for the isolation of nucleic acids or as query sequences for database searches, can be obtained by "back-translation" from the amino acid sequences, or by 25 identification of regions of amino acid identity with polypeptides for which the coding DNA sequence has been identified. The well-known polymerase chain reaction (PCR) procedure can be employed to isolate and amplify a DNA sequence encoding a Thypin polypeptide or a desired combination of Thypin polypeptide fragments. Oligonucleotides that define the desired termini of the combination of DNA fragments are employed as 5' and 3' primers. The oligonucleotides can additionally contain 30 recognition sites for restriction endonucleases, to facilitate insertion of the amplified combination of DNA fragments into an expression vector. PCR techniques are described in Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; and *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

35 Nucleic acid molecules of the invention include DNA and RNA in both single-stranded and double-stranded form, as well as the corresponding complementary sequences. DNA includes, for example, cDNA, genomic DNA, chemically synthesized DNA, DNA amplified by PCR, and combinations thereof. The nucleic acid molecules of the invention include full-length genes or cDNA molecules as well as a combination of fragments thereof. The nucleic acids of the invention are 40 preferentially derived from human sources, but the invention includes those derived from non-human species, as well.

5 An "isolated nucleic acid molecule" is one that has been separated from adjacent genetic sequences present in the genome of the organism from which the nucleic acid was isolated, in the case of nucleic acids isolated from naturally-occurring sources. In the case of nucleic acids synthesized enzymatically from a template or chemically, such as PCR products, cDNA molecules, or oligonucleotides for example, it is understood that the nucleic acids resulting from such processes are isolated nucleic acids. An isolated nucleic acid molecule refers to a nucleic acid molecule in the form of a separate fragment or as a component of a larger nucleic acid construct. In one preferred embodiment, isolated nucleic acids are substantially free from contaminating endogenous material. The nucleic acid molecule has preferably been derived from DNA or RNA isolated at least once in substantially pure form and in a quantity or concentration enabling identification, manipulation, and recovery of its component nucleotide sequences by standard biochemical methods (such as those outlined in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Such sequences are preferably provided and/or constructed in the form of an open reading frame uninterrupted by internal non-translated sequences, or introns, that are typically present in eukaryotic genes. Sequences of non-translated DNA can be present 5' or 3' from an open reading frame, where the same do not interfere with manipulation or expression of the coding region.

The present invention also includes nucleic acids that hybridize under moderately stringent conditions, and more preferably under highly stringent conditions, to the complement of nucleic acid molecules that encode the Thypin polypeptides described herein. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4), and can be readily determined by those having ordinary skill in the art based on, for example, the length and/or base composition of the DNA. One way of achieving moderately stringent conditions for filter-bound target DNA involves the use of a prewashing solution containing 5 x SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0), hybridization buffer of about 6 x SSC, and a hybridization temperature of about 68°C (or other similar hybridization solutions, such as one containing about 50% formamide, with a hybridization temperature of about 42°C), and washing conditions of about 60°C, in 0.5 x SSC, 0.1% SDS. "SSC" (1x) is 0.15 M NaCl, 0.015 M Na citrate, pH 7.0. Generally, highly stringent conditions are defined as hybridization conditions as above, but with washing at approximately 68°C, 0.2 x SSC, 0.1% SDS. If desired, SSPE (1 x SSPE is 0.15M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, and 1.25 mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC in the hybridization and wash buffers, and the SDS can be omitted from any of the above the buffers without affecting the stringency. Washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete. Wash temperature and wash salt concentration can be adjusted as necessary to achieve a desired degree of stringency by applying the basic principles that govern hybridization reactions and duplex stability, as known to those skilled in the art and described further

WO 02/072769

23

PCT/US02/07215

5 below (see, e.g., Sambrook et al., 1989). The hybridization temperature for hybrid duplexes anticipated to be less than 50 base pairs in length optimally is 5 to 10°C below the melting temperature (T_m) of the duplex, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m (°C) = $2(\# \text{ of A + T bases}) + 4(\# \text{ of G + C bases})$. For hybrids above 18 base pairs in length, T_m (°C) = $81.5 + 16.6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{ G + C}) - (600/N)$, where N is the number of bases in the hybrid, and $[\text{Na}^+]$ is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ($[\text{Na}^+]$ for 1xSSC = 0.165M). Preferably, each such hybridizing nucleic acid has a length that is at least 15 nucleotides (or more preferably at least 18 nucleotides, or at least 20 nucleotides, or at least 25 nucleotides, or at least 30 nucleotides, or at least 40 nucleotides, or most preferably at least 50 nucleotides), or at least 25% (more preferably at least 50%, or at least 60%, or at least 70%, and most preferably at least 80%) of the length of the nucleic acid of the present invention to which it hybridizes, and has at least 60% sequence identity (more preferably at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, or at least 99%, and most preferably at least 99.5%) with the nucleic acid of the present invention to which it hybridizes, where sequence identity is determined by comparing the sequences of the hybridizing nucleic acids when aligned so as to maximize overlap and identity while minimizing sequence gaps.

10 The present invention also provides genes corresponding to the nucleic acid sequences disclosed herein. "Corresponding genes" or "corresponding genomic nucleic acids" are the regions of the genome that are transcribed to produce the mRNAs from which cDNA nucleic acid sequences are derived and may include contiguous regions of the genome necessary for the regulated expression of such genes. Corresponding genes may therefore include but are not limited to coding sequences, 5' and 3' untranslated regions, alternatively spliced exons, introns, promoters, enhancers, and silencer or suppressor elements. The corresponding genes can be isolated in accordance with known methods using the sequence information disclosed herein, for example, for designing probes or PCR primers. Such methods include the preparation of probes or primers from the disclosed sequence information for identification and/or amplification of genes in appropriate genomic libraries or other sources of genomic materials. An "isolated gene" or "an isolated genomic nucleic acid" is a genomic nucleic acid that has been separated from the adjacent genomic sequences present in the genome of the organism from which the genomic nucleic acid was isolated.

35 **Methods for Making and Purifying Thypin Polypeptides**

Methods for the expression, isolation, and purification of the polypeptides and fragments of the invention can be accomplished by any suitable technique, including but not limited to the following methods. Preferred host cells for producing recombinant Thypin polypeptides are COS-7, CV-1, 293 and CHO cells. The glycosylation profile of these Thypin polypeptides is important to their activity.

40 Other preferred polypeptide processing methods for making Thypin polypeptides involve the use of certain processing, binding, or chaperone polypeptides.

5 The isolated nucleic acid of the invention may be operably linked to an expression control sequence such as that in the pDC412 or pDC314 vectors, or the pMT2 or pED expression vectors disclosed in Kaufman et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490 (1991); and Pouwels et al. *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985), in order to produce the polypeptide recombinantly. Many suitable expression control sequences are known in the art. General methods of
 10 expressing recombinant polypeptides are also known, such as those described in R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185, 537-566 (1990). As used herein "operably linked" means that the nucleic acid of the invention and an expression control sequence are situated within a construct, vector, or cell in such a way that the polypeptide encoded by the nucleic acid is expressed when appropriate molecules (such as polymerases) are present. As one embodiment of the invention, at least one expression control
 15 sequence is operably linked to the nucleic acid of the invention in a recombinant host cell or progeny thereof, the nucleic acid and/or expression control sequence having been introduced into the host cell by transformation or transfection, for example, or by any other suitable method. As another embodiment of the invention, at least one expression control sequence is integrated into the genome of a recombinant host cell such that it is operably linked to a nucleic acid sequence encoding a
 20 polypeptide of the invention. In a further embodiment of the invention, at least one expression control sequence is operably linked to a nucleic acid of the invention through the action of a trans-acting factor such as a transcription factor, either *in vitro* or in a recombinant host cell.

In addition, a sequence encoding a signal peptide (native or heterologous) that promotes secretion can be incorporated into expression vectors. The choice of signal peptide or leader can
 25 depend on factors such as the type of host cells in which the recombinant polypeptide is to be produced. To illustrate, examples of heterologous signal peptides that are functional in mammalian host cells include the signal sequence for interleukin-7 (IL-7) described in United States Patent 4,965,195; the signal sequence for interleukin-2 receptor described in Cosman et al., *Nature* 312:768 (1984); the interleukin-4 receptor signal peptide described in EP 367,566; the type I interleukin-1
 30 receptor signal peptide described in U.S. Patent 4,968,607; and the type II interleukin-1 receptor signal peptide described in EP 460,846. A DNA sequence for a signal peptide (secretory leader) can be fused in frame to the nucleic acid sequence of the invention so that the DNA is initially transcribed, and the mRNA translated, into a fusion polypeptide comprising the signal peptide. A signal peptide that is functional in the intended host cells is one that promotes extracellular secretion of the polypeptide in
 35 that host cell. The signal peptide is cleaved from the polypeptide upon secretion of polypeptide from the cell. The skilled artisan will also recognize that the position(s) at which the signal peptide is cleaved can differ from that predicted by computer program, and can vary according to such factors as the type of host cells employed in expressing a recombinant polypeptide. A polypeptide preparation can include a mixture of polypeptide molecules having different N-terminal amino acids, resulting from
 40 cleavage of the signal peptide at more than one site.

Established methods for introducing DNA into mammalian cells have been described (Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69). Additional protocols using

WO 02/072769

25

PCT/US02/07215

5 commercially available reagents, such as Lipofectamine lipid reagent (Gibco/BRL) or Lipofectamine-Plus lipid reagent, can be used to transfect cells (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1987). In addition, electroporation can be used to transfect mammalian cells using conventional procedures, such as those in Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Selection of stable transformants can be performed using methods known in the art, such as, for example, resistance to cytotoxic drugs. Kaufman et al., *Meth. in Enzymology* 185:487-511, 1990, describes several selection schemes, such as dihydrofolate reductase (DHFR) resistance. A suitable strain for DHFR selection is CHO strain DX-B11, which is deficient in DHFR (Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 1980). A plasmid expressing the DHFR cDNA can be introduced into strain DX-B11, and only cells that contain the plasmid can grow in the appropriate selective medium. Other examples of selectable markers that can be incorporated into an expression vector include cDNAs conferring resistance to antibiotics, such as G418 and hygromycin B. Cells harboring the vector can be selected on the basis of resistance to these compounds.

Alternatively, Thypin gene products can be obtained via homologous recombination, or "gene targeting," techniques. Such techniques employ the introduction of exogenous transcription control elements (such as the CMV promoter or the like) in a particular predetermined site on the genome, to induce expression of the endogenous nucleic acid sequence of interest (see, for example, U.S. Patent No. 5,272,071). The location of integration into a host chromosome or genome can be easily determined by one of skill in the art, given the known location and sequence of the gene. In a preferred embodiment, the present invention also contemplates the introduction of exogenous transcriptional control elements in conjunction with an amplifiable gene, to produce increased amounts of the gene product, again, without the need for isolation of the gene sequence itself from the host cell.

A number of types of cells may act as suitable host cells for expression of the polypeptide. Mammalian host cells include, for example, the COS-7 line of monkey kidney cells (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., *Cell* 23:175, 1981), L cells, C127 cells, 3T3 cells (ATCC CCL 163), Chinese hamster ovary (CHO) cells, HeLa cells, BHK (ATCC CRL 10) cell lines, the CV1/EBNA cell line derived from the African green monkey kidney cell line CV1 (ATCC CCL 70) as described by McMahan et al. (*EMBO J.* 10: 2821, 1991), human kidney 293 cells, human epidermal A431 cells, human Colo205 cells, other transformed primate cell lines, normal diploid cells, cell strains derived from in vitro culture of primary tissue, primary explants, HL-60, U937, HaK or Jurkat cells. Alternatively, the polypeptide may be produced in lower eukaryotes such as yeast or in prokaryotes such as bacteria. Suitable yeast strains include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida spp.*, *Pichia spp.* or any yeast strain capable of expressing heterologous polypeptides. Potentially suitable bacterial strains include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, or any bacterial strain capable of expressing heterologous polypeptides. If the polypeptide is made in yeast or bacteria, it may be necessary to modify the polypeptide produced therein, for example by phosphorylation or glycosylation of the appropriate sites, in order to obtain a

5 functional Thypin polypeptide. Such covalent attachments may be accomplished using known chemical or enzymatic methods. The polypeptide may also be produced by operably linking the isolated nucleic acid of the invention to suitable control sequences in one or more insect expression vectors, and employing an insect expression system. Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form from, e.g., Invitrogen, San Diego, Calif., U.S.A. (the
10 MaxBac® kit), and such methods are well known in the art, as described in Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), and Luckow and Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988). As used herein, an insect cell that is modified to express an exogenous nucleic acid of the present invention is considered "transformed." Cell-free translation systems may also be employed to produce polypeptides using RNAs derived from nucleic acid constructs disclosed herein. A host cell
15 that comprises an isolated nucleic acid of the invention, preferably operably linked to at least one expression control sequence, is a "recombinant host cell".

The polypeptide of the invention may be prepared by culturing transformed host cells under culture conditions suitable to support expression of the recombinant polypeptide. The resulting expressed polypeptide may then be purified from such culture (i.e., from culture medium or cell
20 extracts) using known purification processes, such as selective precipitation with various salts, gel filtration and ion exchange chromatography. The purification of the polypeptide may also include an affinity column containing agents that will bind to the polypeptide; one or more column steps over such affinity resins as concanavalin A-agarose, heparin-toyopearl® or Cibacrom blue 3GA Sepharose®; one or more steps involving hydrophobic interaction chromatography using such resins as phenyl ether,
25 butyl ether, or propyl ether; or immunoaffinity chromatography using an antibody that specifically binds one or more Thypin epitopes.

Alternatively, the polypeptide of the invention may also be expressed in a form that will facilitate purification. For example, it may be expressed as a fusion polypeptide, that is, it may be fused with a maltose binding polypeptide (MBP), glutathione-S-transferase (GST), thioredoxin (TRX) or
30 polyHIS. Kits for expression and purification of such fusion polypeptides are commercially available from New England BioLab (Beverly, Mass.), Pharmacia (Piscataway, N.J.) and Invitrogen, respectively. The polypeptide can also be tagged with a non-Thypin epitope and subsequently purified by using a specific antibody directed to such epitope. One such epitope (FLAG®) is commercially available from Kodak (New Haven, Conn.). Finally, one or more reverse-phase high performance
35 liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify the polypeptide. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations, can also be employed to provide a substantially homogeneous isolated recombinant polypeptide. The polypeptide thus purified is substantially free of other mammalian polypeptides and is defined in accordance with the present
40 invention as an "isolated polypeptide." The aforescribed purification method may be used to isolate Thypin and Thypin fragments as well as antibodies that bind to Thypin polypeptides, fragments, variants, binding partners etc. The polypeptide of the invention may also be expressed as a product of

5 transgenic animals, e.g., as a component of the milk of transgenic cows, goats, pigs, or sheep which are characterized by containing somatic or germ cells into which has been inserted a nucleic acid encoding a human Thypin polypeptide.

It is also possible to utilize an affinity column comprising a polypeptide capable of binding to Thypin polypeptides, such as a monoclonal antibody generated against Thypin or against an antigenic fragment thereof, to affinity-purify expressed Thypin polypeptides. These Thypin polypeptides can be removed from an affinity column using conventional techniques, e.g., in a high salt elution buffer and then dialyzed into a lower salt buffer for use or by changing pH or other components depending on the affinity matrix utilized, or be competitively removed using the naturally occurring substrate of the affinity moiety, such as a polypeptide derived from the invention. In this aspect of the invention, 15 Thypin-binding polypeptides, such as the anti-Thypin antibodies of the invention or other polypeptides that can interact with Thypin or fragments thereof, can be bound to a solid phase support such as a column chromatography matrix or a similar substrate suitable for identifying, separating, or purifying cells that express polypeptides of the invention on their surface. Adherence of Thypin-binding polypeptides of the invention to a solid phase contacting surface can be accomplished by any means, 20 for example, magnetic microspheres can be coated with these polypeptide-binding polypeptides and held in the incubation vessel through a magnetic field. Suspensions of cell mixtures are contacted with the solid phase that has such polypeptide-binding polypeptides thereon. Cells having polypeptides of the invention on their surface bind to the fixed Thypin-binding polypeptide and unbound cells then are washed away. This affinity-binding method is useful for purifying, screening, or separating such 25 Thypin-expressing cells from solution. Methods of releasing positively selected cells from the solid phase are known in the art and encompass, for example, the use of enzymes. Such enzymes are preferably non-toxic and non-injurious to the cells and are preferably directed to cleaving the cell-surface binding partner. Alternatively, mixtures of cells suspected of containing polypeptide-expressing cells of the invention first can be incubated with a biotinylated Thypin-binding polypeptide 30 of the invention. The resulting mixture then is passed through a column packed with avidin-coated beads, whereby the high affinity of biotin for avidin provides the binding of the polypeptide-binding cells to the beads. Use of avidin-coated beads is known in the art. See Berenson, et al. *J. Cell. Biochem.*, 10D:239 (1986). Wash of unbound material and the release of the bound cells is performed using conventional methods.

35 The polypeptide may also be produced by known conventional chemical synthesis. The synthetically-constructed polypeptide sequences, by virtue of sharing primary, secondary or tertiary structural and/or conformational characteristics with polypeptides may possess biological properties in common therewith, including polypeptide activity. Thus, they may be employed as biologically active or immunological substitutes for natural, purified polypeptides in screening of therapeutic compounds and in immunological processes for the development of antibodies. 40

The desired degree of purity depends on the intended use of the polypeptide. A relatively high degree of purity is desired when the polypeptide is to be administered *in vivo*, for example. In such a

WO 02/072769

28

PCT/US02/07215

5 case, the polypeptides are purified such that no polypeptide bands corresponding to other polypeptides are detectable upon analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It will be recognized by one skilled in the pertinent field that multiple bands corresponding to the polypeptide can be visualized by SDS-PAGE, due to differential glycosylation, differential post-translational processing, and the like. Most preferably, the polypeptide of the invention is purified to substantial
 10 homogeneity, as indicated by a single polypeptide band upon analysis by SDS-PAGE. The polypeptide band can be visualized by silver staining, Coomassie blue staining, or (if the polypeptide is radiolabeled) by autoradiography.

Antagonists and Agonists of Thypin Polypeptides

15 Any method which neutralizes Thypin polypeptides or inhibits expression of the Thypin genes (either transcription or translation) can be used to reduce the biological activities of Thypin polypeptides. In particular embodiments, antagonists inhibit the binding of at least one Thypin polypeptide to cells, thereby inhibiting biological activities induced by the binding of those Thypin polypeptides to the cells. In other embodiments, antagonists inhibit the binding of at least one Thypin
 20 polypeptide to a target protease. In yet other embodiments, antagonists can be designed to reduce the level of endogenous Thypin gene expression, *e.g.*, using well-known antisense or ribozyme approaches to inhibit or prevent translation of Thypin mRNA transcripts; triple helix approaches to inhibit transcription of Thypin genes; or targeted homologous recombination to inactivate or "knock out" the Thypin genes or their endogenous promoters or enhancer elements. Such antisense, ribozyme, and
 25 triple helix antagonists may be designed to reduce or inhibit either unimpaired, or if appropriate, mutant Thypin gene activity. Techniques for the production and use of such molecules are well known to those of skill in the art.

Antisense RNA and DNA molecules can act to directly block the translation of mRNA by hybridizing to targeted endogenous mRNA thereby preventing translation. This antisense approach
 30 involves designing oligonucleotides (either DNA or RNA) that are complementary to a Thypin mRNA. The antisense oligonucleotides will bind to the complementary target gene mRNA transcripts and prevent translation. Absolute complementarity, although preferred, is not required. An antisense molecule "complementary" to Thypin nucleic acid, as referred to herein, means a sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize with the target nucleic acid, forming a stable duplex
 35 (or triplex, as appropriate). In the case of double-stranded antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA may thus be tested, or triplex formation may be assayed. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity and the length of the antisense nucleic acid. Preferred oligonucleotides are those that are complementary to the 5' end of the message, *e.g.*, the 5' untranslated sequence up to and including the AUG initiation codon. However, oligonucleotides complementary to
 40 the 5'- or 3'- non-translated, non-coding regions of the Thypin gene transcript, or to the coding regions, may be used.

WO 02/072769

29

PCT/US02/07215

- 5 Antisense oligonucleotides complementary to the 5' untranslated region of the mRNA preferably include the complement of the AUG start codon. Antisense nucleic acids should be at least six nucleotides in length, and are preferably oligonucleotides ranging from 6 to about 50 nucleotides in length. In specific aspects the oligonucleotide is at least 10 nucleotides, at least 17 nucleotides, at least 25 nucleotides or at least 50 nucleotides. The oligonucleotides can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. Chimeric
- 10 oligonucleotides, oligonucleosides, or mixed oligonucleotides/oligonucleosides of the invention can be of several different types. These include a first type wherein the "gap" segment of nucleotides is positioned between 5' and 3' "wing" segments of linked nucleosides and a second "open end" type wherein the "gap" segment is located at either the 3' or the 5' terminus of the oligomeric compound (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,985,664). Oligonucleotides of the first type are also known in the art as "gapmers" or gapped oligonucleotides. Oligonucleotides of the second type are also known in the art as "hemimers" or "wingmers". The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone, for example, to improve stability of the molecule, hybridization, etc. The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell
- 20 receptors in vivo), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger *et al.*, 1989, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 86: 6553-6556; Lemaire *et al.*, 1987, Proc Natl Acad Sci 84: 648-652; PCT Publication No. WO88/09810), or hybridization-triggered cleavage agents or intercalating agents. (See, e.g., Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549). The antisense molecules should be delivered to cells which express the Thypin transcript in vivo.
- 25 A number of methods have been developed for delivering antisense DNA or RNA to cells; e.g., antisense molecules can be injected directly into the tissue or cell derivation site, or modified antisense molecules, designed to target the desired cells (e.g., antisense linked to peptides or antibodies that specifically bind receptors or antigens expressed on the target cell surface) can be administered systemically. However, it is often difficult to achieve intracellular concentrations of the antisense sufficient to suppress translation of endogenous mRNAs. Therefore a preferred approach utilizes
- 30 a recombinant DNA construct in which the antisense oligonucleotide is placed under the control of a strong pol III or pol II promoter. The use of such a construct to transfect target cells in the patient will result in the transcription of sufficient amounts of single stranded RNAs that will form complementary base pairs with the endogenous Thypin gene transcripts and thereby prevent translation of the Thypin mRNA. For example, a vector can be introduced in vivo such that it is taken up by a cell and directs the transcription of an antisense RNA. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired antisense RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology methods standard in the art. Vectors can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in mammalian cells.
- 35 Ribozyne molecules designed to catalytically cleave Thypin mRNA transcripts can also be used to prevent translation of Thypin mRNA and expression of Thypin polypeptides. (See, e.g., PCT International Publication WO90/11364, published Oct. 4, 1990; US Patent No. 5,824,519). The
- 40

WO 02/072769

30

PCT/US02/07215

5 ribozymes that can be used in the present invention include hammerhead ribozymes (Haseloff and Gerlach, 1988, *Nature*, 334:585-591), RNA endoribonucleases (hereinafter "Cech-type ribozymes") such as the one which occurs naturally in *Tetrahymena thermophila* (known as the IVS, or L-19 IVS RNA) and which has been extensively described (see, for example, WO 88/04300; Been and Cech, *Cell*, 47:207-216 (1986)). As in the antisense approach, the ribozymes can be composed of modified
 10 oligonucleotides (e.g. for improved stability, targeting, etc.) and should be delivered to cells which express the Thypin polypeptide in vivo. A preferred method of delivery involves using a DNA construct encoding the ribozyme under the control of a strong constitutive pol III or pol II promoter, so that transfected cells will produce sufficient quantities of the ribozyme to destroy endogenous Thypin messages and inhibit translation. Because ribozymes, unlike antisense molecules, are catalytic, a lower
 15 intracellular concentration is required for efficacy.

Alternatively, endogenous Thypin gene expression can be reduced by using deoxyribonucleotide sequences complementary to the regulatory region of the target gene (i.e., the target gene promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the target Thypin gene. (See generally, Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6), 569-584; Helene, et al.,
 20 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660, 27-36; and Maher, 1992, *Bioassays* 14(12), 807-815).

Anti-sense RNA and DNA, ribozyme, and triple helix molecules of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of DNA and RNA molecules, including, for example, solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Oligonucleotides can be synthesized by standard methods known in the art, e.g. by use of an automated DNA synthesizer (such as are
 25 commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein *et al.*, 1988, *Nucl. Acids Res.* 16:3209. Methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451). Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* or *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA
 30 sequences may be incorporated into a wide variety of vectors that incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

Endogenous target gene expression can also be reduced by inactivating or "knocking out" the target gene or its promoter using targeted homologous recombination (e.g., see Smithies, et al., 1985, *Nature* 317, 230-234; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51, 503-512; Thompson, et al., 1989, *Cell* 5, 313-321). For example, a mutant, non-functional target gene (or a completely unrelated DNA sequence) flanked by DNA homologous to the endogenous target gene (either the coding regions or regulatory regions of the target gene) can be used, with or without a selectable marker and/or a negative
 40 selectable marker, to transfect cells that express the target gene in vivo. Insertion of the DNA construct, via targeted homologous recombination, results in inactivation of the target gene. Such approaches are particularly suited in the agricultural field where modifications to ES (embryonic stem)

WO 02/072769

31

PCT/US02/07215

- 5 cells can be used to generate animal offspring with an inactive target gene (e.g., see Thomas and
 Capecchi, 1987 and Thompson, 1989, *supra*), or in model organisms such as *Caenorhabditis elegans*
 where the "RNA interference" ("RNAi") technique (Grishok A, Tabara H, and Mello CC, 2000,
 Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*, *Science* 287 (5462): 2494-2497), or the
 introduction of transgenes (Dernburg AF, Zalevsky J, Colaiacovo MP, and Villeneuve AM, 2000,
 10 Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line, *Genes Dev.* 14 (13): 1578-1583) are
 used to inhibit the expression of specific target genes. However this approach can be adapted for use in
 humans provided the recombinant DNA constructs are directly administered or targeted to the required
 site in vivo using appropriate vectors such as viral vectors.

- Organisms that have enhanced, reduced, or modified expression of the gene(s) corresponding
 15 to the nucleic acid sequences disclosed herein are provided. The desired change in gene expression can
 be achieved through the use of antisense nucleic acids or ribozymes that bind and/or cleave the mRNA
 transcribed from the gene (Albert and Morris, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15(7): 250-254; Lavarosky
 et al., 1997, *Biochem. Mol. Med.* 62(1): 11-22; and Hampel, 1998, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*
 58: 1-39). Transgenic animals that have multiple copies of the gene(s) corresponding to the nucleic
 20 acid sequences disclosed herein, preferably produced by transformation of cells with genetic constructs
 that are stably maintained within the transformed cells and their progeny, are provided. Transgenic
 animals that have modified genetic control regions that increase or reduce gene expression levels, or
 that change temporal or spatial patterns of gene expression, are also provided (see European Patent No.
 0 649 464 B1). In addition, organisms are provided in which the gene(s) corresponding to the nucleic
 25 acid sequences disclosed herein have been partially or completely inactivated, through insertion of
 extraneous sequences into the corresponding gene(s) or through deletion of all or part of the
 corresponding gene(s). Partial or complete gene inactivation can be accomplished through insertion,
 preferably followed by imprecise excision, of transposable elements (Plasterk, 1992, *Bioessays* 14(9):
 629-633; Zwaal et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(16): 7431-7435; Clark et al., 1994, *Proc.*
 30 *Natl. Acad. Sci. USA* 91(2): 719-722), or through homologous recombination, preferably detected by
 positive/negative genetic selection strategies (Mansour et al., 1988, *Nature* 336: 348-352; U.S. Pat.
 Nos. 5,464,764; 5,487,992; 5,627,059; 5,631,153; 5,614,396; 5,616,491; and 5,679,523). These
 organisms with altered gene expression are preferably eukaryotes and more preferably are mammals.
 Such organisms are useful for the development of non-human models for the study of disorders
 35 involving the corresponding gene(s), and for the development of assay systems for the identification of
 molecules that interact with the polypeptide product(s) of the corresponding gene(s).

- Also provided are Thypin polypeptide variants with partner binding sites that have been
 altered in conformation so that (1) the Thypin variant will still bind to its partner(s), but a specified
 small molecule will fit into the altered binding site and block that interaction, or (2) the Thypin variant
 40 will no longer bind to its partner(s) unless a specified small molecule is present (see for example
 Bishop et al., 2000, *Nature* 407: 395-401). Nucleic acids encoding such altered Thypin polypeptides
 can be introduced into organisms according to methods described herein, and may replace the

WO 02/072769

32

PCT/US02/07215

5 endogenous nucleic acid sequences encoding the corresponding Thypin polypeptide. Such methods allow for the interaction of a particular Thypin polypeptide with its binding partners to be regulated by administration of a small molecule compound to an organism, either systemically or in a localized manner.

10 The Thypin polypeptides themselves can also be employed in inhibiting a biological activity of Thypin in *in vitro* or *in vivo* procedures. Encompassed within the invention are Thypin polypeptides that act as "dominant negative" inhibitors of native Thypin polypeptide function when expressed as fragments or as components of fusion polypeptides. For example, a purified polypeptide comprising the Thypin RSL domain (amino acids 374 to 395 of SEQ ID NO:2) can be used to inhibit binding of endogenous Thypin polypeptides to endogenous binding partners. Such use effectively would block
15 Thypin polypeptide interactions and inhibit Thypin polypeptide activities.

In a preferred embodiment, antibodies that bind specifically with the Thypin polypeptide shown in SEQ ID NO:2 are used to antagonize the ability of Thypin to inhibit its target protease(s). For example, antibodies that specifically recognize one or more epitopes of Thypin polypeptides, or epitopes of conserved variants of Thypin polypeptides, or peptide fragments of the Thypin polypeptide
20 can be used in the invention to inhibit Thypin polypeptide activity. Such antibodies include but are not limited to polyclonal antibodies, monoclonal antibodies (mABs), humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the above. Such antibodies may be administered in therapeutic doses to treat diseases characterized by overexpression
25 or aberrant expression of Thypin. The ability of a Thypin-specific antibody to antagonize Thypin activity can be determined, for example, in assays that measure the protease-inhibitory activity of Thypin in the presence and absence of the antibody.

Purified and modified Thypin polypeptides of the present invention can be administered to modulate interactions between Thypin polypeptides and Thypin binding partners that are not
30 membrane-bound, such as for example, to modulate interactions of Thypin and target proteases that are present in the extracellular matrix, serum, or in the cytoplasm of cells in which Thypin is expressed. Modulating such interactions can provide a means for the modification of Thypin-influenced bioactivity.

In an alternative aspect, the invention further encompasses the use of agonists of Thypin
35 polypeptide activity to treat or ameliorate the symptoms of a disease for which increased Thypin polypeptide activity is beneficial. In a preferred aspect, the invention entails using compositions comprising of a Thypin nucleic acid or a Thypin polypeptide to cells *in vitro*, to cells *ex vivo*, to cells *in vivo*, and/or to a multicellular organism such as a vertebrate or mammal. Preferred therapeutic forms of Thypin are soluble forms, as described above. In still another aspect of the invention, the invention
40 involves methods comprising administering a therapeutically effective amount of a composition containing Thypin-encoding nucleic acid for expression of a Thypin polypeptide in a host organism for

WO 02/072769

33

PCT/US02/07215

5 treatment of disease, or of administering a therapeutically effective amount of purified recombinant Thypin together with a pharmaceutically acceptable carrier. Such methods are useful for treatment of a pathological condition associated with decreased endogenous activity of a Thypin polypeptide. Furthermore, the invention encompasses the administration to cells and/or organisms of compounds found to increase the endogenous activity of Thypin polypeptides.

10 One example of compounds that increase Thypin polypeptide activity are agonistic antibodies, preferably monoclonal antibodies, that increase Thypin activity when the antibody is bound to Thypin. Alternatively, such an antibody could increase Thypin polypeptide activity for example by preventing the binding to Thypin of a native inhibitor of Thypin polypeptide activity. The ability of a Thypin-specific antibody to antagonize or agonize Thypin activity can be determined in assays that measure the protease-inhibitory activity of Thypin in the presence and absence of the antibody.

Antibodies to Thypin Polypeptides

Antibodies that are specifically immunoreactive with the polypeptides of the invention are provided herein. Such antibodies bind to Thypin polypeptides via the antigen-binding sites of the antibody (as opposed to non-specific binding). In the present invention, specifically binding antibodies
20 are those that will specifically recognize and bind Thypin polypeptides or subportions thereof, homologues, and variants, or Thypin fusion proteins, but that will not bind other protein molecules. In one preferred embodiment, the antibodies are specific for the polypeptides of the present invention, such as the polypeptide whose amino acid sequence is shown in SEQ ID NO:2, and do not cross-react
25 with other proteins. The Thypin polypeptides, fragments, variants and Thypin fusion polypeptides as set forth herein can be employed as "immunogens" in producing antibodies immunoreactive therewith.

The polypeptides, fragments, variants, fusion polypeptides, and so on described herein contain antigenic determinants or epitopes that elicit the formation of antibodies that bind specifically with Thypin. Thypin-specific antibodies do not bind with other known serpins, that is, these antibodies do
30 not bind via their hypervariable region binding site with ov-serpins such as SCCA-1, SCCA-2, hurpin or maspin. These antigenic determinants or epitopes can be either linear or conformational (discontinuous). Linear epitopes are composed of a single section of amino acids of the polypeptide, while conformational or discontinuous epitopes are composed of amino acids sections from different regions of the polypeptide chain that are brought into close proximity upon polypeptide folding
35 (Janeway and Travers, *Immuno Biology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Because folded polypeptides have complex surfaces, the number of epitopes available is quite numerous; however, due to the conformation of the polypeptide and steric hindrances, the number of antibodies that actually bind to the epitopes is less than the number of available epitopes (Janeway and Travers, *Immuno Biology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 2nd ed. 1996)). Epitopes can be identified by any of the
40 methods known in the art. Thus, one aspect of the present invention relates to the antigenic epitopes of Thypin. Such epitopes are useful for raising antibodies, in particular monoclonal antibodies, as

- 5 described in more detail below. Additionally, epitopes from the polypeptides of the invention can be used as research reagents, in assays, and to purify specific binding antibodies from substances such as polyclonal sera or supernatants from cultured hybridomas. Such epitopes or variants thereof can be produced using techniques well known in the art such as solid-phase synthesis, chemical or enzymatic cleavage of a polypeptide, or using recombinant DNA technology.
- 10 The Thypin polypeptide shown in SEQ ID NO:2 or subportions thereof provide suitable proteins for raising Thypin-specific antibodies. For this purpose, contiguous segments comprising at least 15 amino acids of SEQ ID NO:2 are used. Particular subregions of Thypin useful for raising Thypin-specific antibodies include amino acids 61-107, 108-373 and 374-395 of SEQ ID NO:2.
- 15 As to the antibodies that can be elicited by the epitopes of the polypeptides of the invention, whether the epitopes have been isolated or remain part of the polypeptides, both polyclonal and monoclonal antibodies can be prepared by conventional techniques. See, for example, *Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al.* (eds.), Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Kohler and Milstein, (U.S. Pat. No. 4,376,110); the human B-cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, 1984, *J. Immunol.* 133:3001-3005; Cole *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030); and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies specific for the polypeptides of the invention are also contemplated herein. Such hybridomas can be produced and identified by conventional techniques.
- 25 The hybridoma producing the mAb of this invention may be cultivated in vitro or in vivo. Production of high titers of mAbs in vivo makes this the presently preferred method of production. One method for producing such a hybridoma cell line comprises immunizing an animal with a Thypin polypeptide large enough to include at least one Thypin-specific epitope; harvesting spleen cells from the immunized animal; fusing said spleen cells to a myeloma cell line, thereby generating hybridoma cells; and identifying a hybridoma cell line that produces a monoclonal antibody that binds the polypeptide.
- 30 In a preferred embodiment, the antibody will bind native Thypin.
- In another preferred embodiment, the antibody will specifically bind an epitope unique to the complex formed between Thypin and its protease target. Antibodies specific for such complexes are raised by using as antigen the complex formed between Thypin and its protease target. Such antibodies
- 35 are useful in assays to detect the presence of such complexes in tissues, cells, serum or extracellular matrix.
- For the production of antibodies, various host animals may be immunized by injection with one or more of the following: a Thypin polypeptide, a fragment of a Thypin polypeptide, a functional equivalent of a Thypin polypeptide, or a mutant form of a Thypin polypeptide. Such host animals may
- 40 include but are not limited to rabbits, guinea pigs, mice and rats. Various adjuvants may be used to increase the immunologic response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active

- 5 substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*. The monoclonal antibodies can be recovered by conventional techniques. Such monoclonal antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof.
- 10 In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Takeda *et al.*, 1985, *Nature*, 314:452-454; Morrison *et al.*, 1984, *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851-6855; Boulianne *et al.*, 1984, *Nature* 312:643646; Neuberger *et al.*, 1985, *Nature* 314:268-270) by splicing the genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. A chimeric antibody is a molecule in
- 15 which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a porcine mAb and a human immunoglobulin constant region. The monoclonal antibodies of the present invention also include humanized versions of murine monoclonal antibodies. Such humanized antibodies can be prepared by known techniques and offer the advantage of reduced immunogenicity when the antibodies are administered to humans. In one embodiment, a humanized
- 20 monoclonal antibody comprises the variable region of a murine antibody (or just the antigen binding site thereof) and a constant region derived from a human antibody. Alternatively, a humanized antibody fragment can comprise the antigen binding site of a murine monoclonal antibody and a variable region fragment (lacking the antigen-binding site) as well as a constant region derived from a human antibody. Procedures for the production of chimeric and further engineered monoclonal
- 25 antibodies include those described in Riechmann *et al.* (*Nature* 332:323, 1988), Liu *et al.* (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick *et al.* (*BioTechnology* 7:934, 1989), and Winter and Harris (*TIPS* 14:139, Can, 1993). Useful techniques for humanizing antibodies are also discussed in U.S. Patent 6,054,297. Procedures to generate antibodies transgenically can be found in GB 2,272,440, US Patent Nos. 5,569,825 and 5,545,806, and related patents. Preferably, for use in humans, the antibodies are human
- 30 or humanized; techniques for creating such human or humanized antibodies are also well known and are commercially available from, for example, Medarex Inc. (Princeton, NJ) and Abgenix Inc. (Fremont, CA). In another preferred embodiment, fully human antibodies for use in humans are produced by screening a phage display library of human antibody variable domains (Vaughan *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol.* 16(6): 535-539; and U.S. Patent No. 5,969,108).
- 35 Antigen-binding antibody fragments that recognize specific epitopes may be generated by known techniques. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')₂ fragments that can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of the (ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression
- 40 libraries may be constructed (Huse *et al.*, 1989, *Science*, 246:1275-1281) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778; Bird, 1988, *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; and Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-

5 546) can also be adapted to produce single chain antibodies against Thypin gene products. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fc region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide. Such single chain antibodies may also be useful intracellularly (i.e., as 'intrabodies'), for example as described by Marasco *et al.* (*J. Immunol. Methods* 231:223-238, 1999) for genetic therapy in HIV infection. In addition, antibodies to the Thypin polypeptide can, in turn, be utilized to generate anti-idiotypic antibodies that "mimic" the Thypin polypeptide and that may bind to the Thypin polypeptide using techniques well known to those skilled in the art. (See, *e.g.*, Greenspan & Bona, 1993, *FASEB J* 7(5):437-444; and Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438).

Antibodies that are immunoreactive with the polypeptides of the invention include bispecific antibodies (i.e., antibodies that are immunoreactive with the polypeptides of the invention via a first antigen binding domain, and also immunoreactive with a different polypeptide via a second antigen binding domain). A variety of bispecific antibodies have been prepared, and found useful both *in vitro* and *in vivo* (see, for example, U.S. Patent 5,807,706; and Cao and Suresh, 1998, *Bioconjugate Chem* 9: 635-644). Numerous methods of preparing bispecific antibodies are known in the art, including the use of hybrid-hybridomas such as quadromas, which are formed by fusing two differed hybridomas, and triomas, which are formed by fusing a hybridoma with a lymphocyte (Milstein and Cuello, 1983, *Nature* 305: 537-540; U.S. Patent 4,474,893; and U.S. Patent 6,106,833). U.S. Patent 6,060,285 discloses a process for the production of bispecific antibodies in which at least the genes for the light chain and the variable portion of the heavy chain of an antibody having a first specificity are transfected into a hybridoma cell secreting an antibody having a second specificity. Chemical coupling of antibody fragments has also been used to prepare antigen-binding molecules having specificity for two different antigens (Brennan *et al.*, 1985, *Science* 229: 81-83; Glennie *et al.*, *J. Immunol.*, 1987, 139:2367-2375; and U.S. Patent 6,010,902). Bispecific antibodies can also be produced via recombinant means, for example, by using the leucine zipper moieties from the *Fos* and *Jun* proteins (which preferentially form heterodimers) as described by Kostelny *et al.* (*J. Immunol.* 148:1547-4553; 1992). U.S. Patent 5,582,996 discloses the use of complementary interactive domains (such as leucine zipper moieties or other lock and key interactive domain structures) to facilitate heterodimer formation in the production of bispecific antibodies. Tetravalent, bispecific molecules can be prepared by fusion of DNA encoding the heavy chain of an F(ab')₂ fragment of an antibody with either DNA encoding the heavy chain of a second F(ab')₂ molecule (in which the CH1 domain is replaced by a CH3 domain), or with DNA encoding a single chain FV fragment of an antibody, as described in U.S. Patent 5,959,083. Expression of the resultant fusion genes in mammalian cells, together with the genes for the corresponding light chains, yields tetravalent bispecific molecules having specificity for selected antigens. Bispecific antibodies can also be produced as described in U.S. Patent 5,807,706. Generally, the method involves introducing a protuberance (constructed by replacing small amino acid side chains with larger side chains) at the interface of a first polypeptide and a corresponding cavity (prepared by replacing large amino acid side chains with smaller ones) in the interface of a second polypeptide.

WO 02/072769

37

PCT/US02/07215

5 Moreover, single-chain variable fragments (sFvs) have been prepared by covalently joining two variable domains; the resulting antibody fragments can form dimers or trimers, depending on the length of a flexible linker between the two variable domains (Koritt *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10:423-433).

10 Screening procedures by which such antibodies can be identified are well known, and can involve immunoaffinity chromatography, for example. Antibodies can be screened for agonistic (*i.e.*, ligand-mimicking) properties. Agonistic antibodies can be used to induce Thypin-mediated stimulatory pathways or intercellular communication or other Thypin-mediated physiological phenomena.

15 Those antibodies that can block binding of the Thypin polypeptides of the invention to binding partners for Thypin can be used to inhibit Thypin-mediated phenomena that results from such binding. Such blocking antibodies can be identified using any suitable assay procedure, such as by testing antibodies for the ability to inhibit binding of Thypin binding to trypsin-like proteases. Alternatively, blocking antibodies can be identified in assays for the ability to inhibit a biological effect that results from binding of Thypin to its target. Such an antibody can be employed in an *in vitro* procedure, or
20 administered *in vivo* to inhibit a biological activity mediated by Thypin. Disorders caused or exacerbated (directly or indirectly) by the interaction of Thypin with a Thypin binding partner thus can be treated. A therapeutic method involves *in vivo* administration of a blocking antibody to a mammal in an amount effective in inhibiting Thypin-mediated biological activity. Monoclonal antibodies are generally preferred for use in such therapeutic methods. In one embodiment, an antigen-binding
25 antibody fragment is employed. Compositions comprising an antibody that is directed against Thypin, and a physiologically acceptable diluent, excipient, or carrier, are provided herein. Suitable components of such compositions are as described below for compositions containing Thypin polypeptides.

Also provided herein are conjugates comprising a detectable (*e.g.*, diagnostic) or therapeutic
30 agent, attached to the antibody. Examples of such agents are presented above. The conjugates find use in *in vitro* or *in vivo* procedures. The antibodies of the invention can also be used in assays to detect the presence of Thypin polypeptides or fragments thereof, either *in vitro* or *in vivo*. The antibodies also can be employed in purifying polypeptides or fragments of the invention by immunoaffinity chromatography.

35 **Rational Design of Compounds that Interact with Thypin Polypeptides**

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides of interest or of small molecules with which they interact, *e.g.*, inhibitors, agonists, antagonists, etc. This approach can be used to fashion drugs which are more active or stable forms of the polypeptide or which enhance or interfere with the function of a polypeptide *in vivo* (Hodgson J
40 (1991) *Biotechnology* 9:19-21). In one approach, the three-dimensional structure of a polypeptide of interest, or of a polypeptide-inhibitor complex, is determined by x-ray crystallography, by nuclear

5 magnetic resonance, or by computer homology modeling or, most typically, by a combination of these approaches. Both the shape and charges of the polypeptide must be ascertained to elucidate the structure and to determine active site(s) of the molecule. Less often, useful information regarding the structure of a polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous polypeptides. In both cases, relevant structural information is used to design analogous serpin-like
10 molecules, to identify efficient inhibitors, or to identify small molecules that may bind serpins. Useful examples of rational drug design may include molecules which have improved activity or stability as shown by Braxton S and Wells JA (1992 Biochemistry 31:7796-7801) or which act as inhibitors, agonists, or antagonists of native peptides as shown by Athauda SB et al (1993 J Biochem 113:742-746). The use of Thypin polypeptide structural information in molecular modeling software systems to
15 assist in agonist or inhibitor design and agonist-Thypin or inhibitor-Thypin polypeptide interaction is also encompassed by the invention. A particular method of the invention comprises analyzing the three dimensional structure of Thypin polypeptides for likely binding sites of substrates, synthesizing a new molecule that incorporates a predictive reactive site, and assaying the new molecule as described further herein.

20 It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by functional assay, as described further herein, and then to solve its crystal structure. This approach, in principle, yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass polypeptide crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids
25 would be expected to be an analog of the original antigen. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced peptides. The isolated peptides would then act as the pharmacore.

Assays of Thypin Polypeptide Activities

30 The purified Thypin polypeptides of the invention (including polypeptides, polypeptides, fragments, variants, oligomers, and other forms) are useful in a variety of assays. For example, the Thypin molecules of the present invention can be used to identify binding partners of Thypin polypeptides, which can also be used to modulate various physiological phenomena. Alternatively, they can be used to identify non-binding-partner molecules or substances that modulate development,
35 tissue remodeling and so on.

Assays to Identify Binding Partners. Thypin polypeptides and fragments thereof can be used to identify binding partners. For example, they can be tested for the ability to bind a candidate binding partner in any suitable assay, such as a conventional binding assay. To illustrate, the Thypin polypeptide can be labeled with a detectable reagent (*e.g.*, a radionuclide, chromophore, enzyme that
40 catalyzes a colorimetric or fluorometric reaction, and the like). The labeled polypeptide is contacted with candidate serine proteases that are suspected of having the capacity to interact with Thypin. If specific binding occurs, the labelled Thypin is expected to form a heat-stable complex with the

5 protease. These complexes can be detected by any convenient means, which may employ gel electrophoresis or column chromatography.

Compounds that can be assayed for binding to Thypin polypeptides include but are not limited to small organic molecules, such as those that are commercially available - often as part of large combinatorial chemistry compound 'libraries' - from companies such as Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Argyle (Woburn, MA), Enzymed (Iowa City, IA), Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), MDS Panlabs (Bothell, WA), Pharmacopeia (Princeton, NJ), and Trega (San Diego, CA). Preferred small organic molecules for screening using these assays are usually less than 10 kDa molecular weight and may possess a number of physicochemical and pharmacological properties which enhance cell penetration, resist degradation, and/or prolong their physiological half-lives (Gibbs, J., 1994, *Pharmaceutical Research in Molecular Oncology, Cell* 79(2): 193-198). Compounds including natural products, inorganic chemicals, and biologically active materials such as proteins and toxins can also be assayed using these methods for the ability to bind to Thypin polypeptides.

10 Yeast Two-Hybrid or "Interaction Trap" Assays. Where the Thypin polypeptide binds or potentially binds to another polypeptide, the nucleic acid encoding the Thypin polypeptide can also be used in interaction trap assays (such as, for example, that described in Gyuris et al., *Cell* 75:791-803 (1993)) to identify nucleic acids encoding the other polypeptide with which binding occurs or to identify inhibitors of the binding interaction. Polypeptides involved in these binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction.

20 Competitive Binding Assays. Another type of suitable binding assay is a competitive binding assay. To illustrate, biological activity of a variant can be determined by assaying for the variant's ability to compete with the native polypeptide for binding to the candidate binding partner. Competitive binding assays can be performed by conventional methodology. Reagents that can be employed in competitive binding assays include radiolabeled Thypin and intact cells expressing Thypin (endogenous or recombinant). For example, a radiolabeled soluble Thypin fragment can be used to compete with native Thypin for binding to a target protease.

30 Cell Proliferation, Cell Death, Cell Differentiation, and Cell Adhesion Assays.

A polypeptide of the present invention may exhibit cell proliferation (either inducing or inhibiting), or cell differentiation (either inducing or inhibiting) activity, or may induce production of cytokines in certain cell populations. Many polypeptide factors discovered to date have exhibited such activity in one or more factor-dependent cell proliferation assays, and hence the assays serve as a convenient confirmation of cell stimulatory activity. The activity of a polypeptide of the present invention is evidenced by any one of a number of routine factor-dependent cell proliferation assays for cell lines including, without limitation, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, I23, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e and CMK. The activity of a Thypin polypeptide of the invention may, among other means, be measured by the following methods:

40 Assays for T-cell or thymocyte proliferation include without limitation those described in: *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. eds, Greene Publishing Associates and Wiley-

- 5 Interscience (pp. 3.1-3.19: *In vitro* assays for mouse lymphocyte function; Chapter 7: Immunologic studies in humans); Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137: 3494-3500, 1986; Bertagnoli *et al.*, *J. Immunol.* 145: 1706-1712, 1990; Bertagnoli *et al.*, *Cellular Immunology* 133:327-341, 1991; Bertagnoli, *et al.*, *J. Immunol.* 149:3778-3783, 1992; Bowman *et al.*, *J. Immunol.* 152: 1756-1761, 1994.
- 10 Assays for cytokine production and/or proliferation of spleen cells, lymph node cells or thymocytes include, without limitation, those described in: Kruisbeek and Shevach, 1994, Polyclonal T cell stimulation, in *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* eds. Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto; and Schreiber, 1994, Measurement of mouse and human interferon gamma in *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* eds. Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto.
- 15 Assays for proliferation and differentiation of hematopoietic and lymphopoietic cells include, without limitation, those described in: Bottomly *et al.*, 1991, Measurement of human and murine interleukin 2 and interleukin 4, in *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* eds. Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto; deVries *et al.*, *J Exp Med* 173: 1205-1211, 1991; Moreau *et al.*, *Nature* 336:690-692, 1988; Greenberger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2931-2938, 1983;
- 20 Nordan, 1991, Measurement of mouse and human interleukin 6, in *Current Protocols in Immunology* Coligan *et al.* eds. Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto; Smith *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1857-1861, 1986; Bennett *et al.*, 1991, Measurement of human interleukin 11, in *Current Protocols in Immunology* Coligan *et al.* eds. Vol 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto; Ciarletta *et al.*, 1991, Measurement of mouse and human Interleukin 9, in *Current Protocols in Immunology*
- 25 Coligan *et al.* eds. Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto.
- Assays for T-cell clone responses to antigens (which will identify, among others, polypeptides that affect APC-T cell interactions as well as direct T-cell effects by measuring proliferation and cytokine production) include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* eds. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3: *In vitro* assays for mouse lymphocyte function; Chapter 6: Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7: Immunologic studies in humans); Weinberger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6091-6095, 1980; Weinberger *et al.*, *Eur. J. Immun.* 11:405-411, 1981; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 140:508-512, 1988
- 30 Assays for thymocyte or splenocyte cytotoxicity include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* eds. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, *In Vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, *J. Immunol.* 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, *J. Immunol.* 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 140:508-512, 1988; Herrmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, *J. Immunol.* 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, *J. Immunol.* 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, *J. Immunol.* 137:3494-3500, 1986;
- 40

- 5 Bowman et al., J. Virology 61:1992-1998; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoli et al., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown et al., J. Immunol. 153:3079-3092, 1994.
- Assays for T-cell-dependent immunoglobulin responses and isotype switching (which will identify, among others, polypeptides that modulate T-cell dependent antibody responses and that affect Th1/Th2 profiles) include, without limitation, those described in: Maliszewski, J Immunol 144: 3028-3033, 1990; and Mond and Brunswick, 1994, Assays for B cell function: *in vitro* antibody production, in *Current Protocols in Immunology* Coligan et al. eds. Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto.
- Mixed lymphocyte reaction (MLR) assays (which will identify, among others, polypeptides that generate predominantly Th1 and CTL responses) include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. eds, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoli et al., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992.
- Dendritic cell-dependent assays (which will identify, among others, polypeptides expressed by dendritic cells that activate naive T-cells) include, without limitation, those described in: Guery et al., J. Immunol 134:536-544, 1995; Inaba et al., J Exp Med 173:549-559, 1991; Macatonia et al., J Immunol 154:5071-5079, 1995; Porgador et al., J Exp Med 182:255-260, 1995; Nair et al., J Virology 67:4062-4069, 1993; Huang et al., Science 264:961-965, 1994; Macatonia et al., J Exp Med 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj et al., J Clin Invest 94:797-807, 1994; and Inaba et al., J Exp Med 172:631-640, 1990.
- Assays for lymphocyte survival/apoptosis (which will identify, among others, polypeptides that prevent apoptosis after superantigen induction and polypeptides that regulate lymphocyte homeostasis) include, without limitation, those described in: Darzynkiewicz et al., Cytometry 13:795-808, 1992; Gorczyca et al., Leukemia 7:659-670, 1993; Gorczyca et al., Cancer Research 53:1945-1951, 1993; Itoh et al., Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, J Immunol 145:4037-4045, 1990; Zamai et al., Cytometry 14:891-897, 1993; Gorczyca et al., International Journal of Oncology 1:639-648, 1992.
- Assays for polypeptides that influence early steps of T-cell commitment and development include, without limitation, those described in: Antica et al., Blood 84:111-117, 1994; Fine et al., Cell Immunol 155:111-122, 1994; Galy et al., Blood 85:2770-2778, 1995; Toki et al., Proc Natl Acad Sci. USA 88:7548-7551, 1991.
- Assays for embryonic stem cell differentiation (which will identify, among others, polypeptides that influence embryonic differentiation hematopoiesis) include, without limitation, those described in: Johansson et al. Cellular Biology 15:141-151, 1995; Keller et al., Molecular and Cellular Biology 13:473-486, 1993; McClanahan et al., Blood 81:2903-2915, 1993.
- Assays for stem cell survival and differentiation (which will identify, among others, polypeptides that regulate lympho-hematopoiesis) include, without limitation, those described in: Methylcellulose colony forming assays, Freshney, 1994, In *Culture of Hematopoietic Cells*, Freshney et al. eds. pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Hirayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

- 5 89:5907-5911, 1992; Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential, McNiece and Briddell, 1994, In *Culture of Hematopoietic Cells*, Freshney *et al.* eds. pp. 23-39, Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Neben *et al.*, Experimental Hematology 22:353-359, 1994; Ploemacher, 1994, Cobblestone area forming cell assay, In *Culture of Hematopoietic Cells*, Freshney *et al.* eds. pp. 1-21, Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Spooncer *et al.*, 1994, Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, In *Culture of Hematopoietic Cells*, Freshney *et al.* eds. pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Sutherland, 1994, Long term culture initiating cell assay, In *Culture of Hematopoietic Cells*, Freshney *et al.* eds. Vol pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., New York, NY.
- 10 Assays for tissue generation activity include, without limitation, those described in: International Patent Publication No. WO95/16035 (bone, cartilage, tendon); International Patent Publication No. WO95/05846 (nerve, neuronal); International Patent Publication No. WO91/07491 (skin, endothelium). Assays for wound healing activity include, without limitation, those described in: Winter, Epidermal Wound Healing, pps. 71-112 (Maibach and Rovee, eds.), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, as modified by Eaglstein and Mertz, J. Invest. Dermatol 71:382-84 (1978).
- 15 Assays for activin/inhibin activity include, without limitation, those described in: Vale *et al.*, Endocrinology 91:562-572, 1972; Ling *et al.*, Nature 321:779-782, 1986; Vale *et al.*, Nature 321:776-779, 1986; Mason *et al.*, Nature 318:659-663, 1985; Forage *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3091-3095, 1986.
- 20 Assays for cell movement and adhesion include, without limitation, those described in: *Current Protocols in Immunology* Coligan *et al.* eds, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 6.12, Measurement of alpha and beta chemokines 6.12.1-6.12.28); Taub *et al.* J. Clin. Invest. 95:1370-1376, 1995; Lind *et al.* APMIS 103:140-146, 1995; Muller *et al.* Eur. J. Immunol. 25: 1744-1748; Gruber *et al.* J Immunol. 152:5860-5867, 1994; Johnston *et al.* J Immunol. 153: 1762-1768, 1994.
- 25 Assay for hemostatic and thrombolytic activity include, without limitation, those described in: Linet *et al.*, J. Clin. Pharmacol. 26:131-140, 1986; Burdick *et al.*, Thrombosis Res. 45:413-419, 1987; Humphrey *et al.*, Fibrinolysis 5:71-79 (1991); Schaub, Prostaglandins 35:467-474, 1988.
- 30 Assays for receptor-ligand activity include without limitation those described in: *Current Protocols in Immunology* Coligan *et al.* eds, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 7.28, Measurement of cellular adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22); Takai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6864-6868, 1987; Bierer *et al.*, J. Exp. Med. 168:1145-1156, 1988; Rosenstein *et al.*, J. Exp. Med. 169:149-160 1989; Stollenborg *et al.*, J. Immunol. Methods 175:59-68, 1994; Stitt *et al.*, Cell 80:661-670, 1995.
- 35 Assays for cadherin adhesive and invasive suppressor activity include, without limitation, those described in: Hortsch *et al.* J Biol Chem 270 (32): 18809-18817, 1995; Miyaki *et al.* Oncogene 11: 2547-2552, 1995; Ozawa *et al.* Cell 63:1033-1038, 1990.
- 40

5 Diagnostic and Other Uses of Thylin Polypeptides and Nucleic Acids

The nucleic acids encoding the Thylin polypeptides provided by the present invention can be used for numerous diagnostic or other useful purposes. The nucleic acids of the invention can be used to express recombinant Thylin polypeptide for analysis, characterization or therapeutic use; as markers for tissues in which the corresponding polypeptide is preferentially expressed (either constitutively or at a particular stage of tissue differentiation or development or in disease states); as molecular weight markers on Southern gels; as chromosome markers or tags (when labeled) to identify chromosome 18 or to map the position of an unknown genes; to compare with endogenous DNA sequences in patients to identify potential genetic disorders; as probes to hybridize and thus discover novel, related DNA sequences; as a source of information to derive PCR primers for genetic fingerprinting; as a probe to "subtract-out" known sequences in the process of discovering other novel nucleic acids; for selecting and making oligomers for attachment to a "gene chip" or other support, including for examination of expression patterns; to raise anti-polypeptide antibodies using DNA immunization techniques; as an antigen to raise anti-DNA antibodies or elicit another immune response, and for use in gene therapy.

Uses of Thylin polypeptides and fragmented polypeptides include, but are not limited to, the following: purifying polypeptides and measuring the activity thereof; delivery agents; therapeutic and research reagents; molecular weight and isoelectric focusing markers; controls for peptide fragmentation; identification of unknown polypeptides; and preparation of Thylin-specific antibodies. Any or all nucleic acids suitable for these uses are capable of being developed into reagent grade materials or kit format for commercialization as products. Methods for performing the uses listed above are well known to those skilled in the art. References disclosing such methods include without limitation "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis eds., 1989, and "Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press, Berger, S. L. and A. R. Kimmel eds., 1987

Probes and Primers. Among the uses of the disclosed Thylin nucleic acids, and combinations of fragments thereof, is the use of fragments as probes or primers. Such fragments generally comprise at least about 17 contiguous nucleotides of a DNA sequence. In other embodiments, a DNA fragment comprises at least 30, or at least 60, contiguous nucleotides of a DNA sequence. The basic parameters affecting the choice of hybridization conditions and guidance for devising suitable conditions are set forth by Sambrook et al., 1989 and are described in detail above. Using knowledge of the genetic code in combination with the amino acid sequences set forth above, sets of degenerate oligonucleotides can be prepared. Such oligonucleotides are useful as primers, e.g., in polymerase chain reactions (PCR), whereby DNA fragments are isolated and amplified. In certain embodiments, degenerate primers can be used as probes for non-human genetic libraries. Such libraries would include but are not limited to cDNA libraries, genomic libraries, and even electronic EST (express sequence tag) or DNA libraries. Homologous sequences identified by this method would then be used as probes to identify non-human Thylin homologues.

WO 02/072769

44

PCT/US02/07215

5 Chromosome Mapping. The nucleic acids encoding Thypin polypeptides, and the disclosed fragments and combinations of these nucleic acids, can be used by those skilled in the art as a chromosome marker for human 18q21.3. In addition, nucleic acids of the invention or a fragment thereof can be used as a positional marker to map other genes of unknown location. Useful techniques include, but are not limited to, using the Thypin nucleic acid sequence or portions thereof, including
10 oligonucleotides, as a probe in various well-known techniques such as radiation hybrid mapping (high resolution), *in situ* hybridization to chromosome spreads (moderate resolution), and Southern blot hybridization to hybrid cell lines containing individual human chromosomes (low resolution).

For radiation hybridization, PCR is first performed using the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research Gen ebridge4 panel of 93 radiation hybrids. For this method, PCR primers are
15 used that lie within a putative exon of the gene of interest and that amplify a product from human genomic DNA, but that do not amplify hamster genomic DNA. The results of the PCRs are converted into a data vector that is submitted to the Whitehead/MIT Radiation Mapping site on the world-wide web at seq.wi.mit.edu. The data is scored and the chromosomal assignment and placement relative to known Sequence Tag Site (STS) markers on the radiation hybrid map is provided. Additional
20 information about radiation hybrid mapping also can be accessed at the Whitehead/MIT website at genome.wi.mit.edu.

Diagnostics and Gene Therapy. The nucleic acids encoding Thypin polypeptides, and the disclosed fragments and combinations of these nucleic acids can be used by one skilled in the art using well-known techniques to analyze abnormalities associated with the Thypin gene or variants thereof.
25 By this means, one can distinguish conditions in which this marker is rearranged or deleted and can use this information for diagnosing certain medical disorders. Thypin DNA furthermore can be used in developing treatments for any disorder mediated (directly or indirectly) by defective, or insufficient amounts of, the genes corresponding to the nucleic acids of the invention. Disclosure herein of native nucleotide sequences permits the detection of defective genes, and the replacement thereof with a
30 normal Thypin gene using gene therapy techniques known in the art. Defective genes can be detected *in vitro* diagnostic assays, and by comparison of a native nucleotide sequence disclosed herein with that of a gene derived from a person suspected of harboring a defect in a Thypin gene.

Methods of Screening for Binding Partners. The Thypin polypeptides and fragments thereof can be used as reagents in methods to screen for or identify Thypin binding partners, such as target
35 proteases that are inhibited by Thypin. For example, purified recombinant Thypin polypeptides can be attached to a solid support material and used as a reagent to trap its protease binding partner(s) in a manner similar to affinity chromatography. In particular embodiments, a polypeptide is attached to a solid support by conventional procedures. As one example, chromatography columns are available that contain functional groups that will react with functional groups on amino acid side chains of
40 polypeptides (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). In an alternative, a Thypin/Fc polypeptide (as discussed above) is attached to protein A- or protein G-containing chromatography columns through interaction with the Fc moiety.

5 The Thypin polypeptides also find use in identifying cells that express a Thypin binding partner on the cell surface. Purified Thypin polypeptides are bound to a solid phase such as a column chromatography matrix or a similar suitable substrate. For example, magnetic microspheres can be coated with the polypeptides and held in an incubation vessel through a magnetic field. Suspensions of cell mixtures containing potential binding-partner-expressing cells are contacted with the solid phase
10 having the polypeptides thereon. Cells expressing the binding partner on the cell surface bind to the fixed polypeptides, and unbound cells are washed away. Alternatively, Thypin polypeptides can be conjugated to a detectable moiety, then incubated with cells to be tested for binding partner expression. After incubation, unbound labeled matter is removed and the presence or absence of the detectable moiety on the cells is determined. In a further alternative, mixtures of cells suspected of expressing the
15 binding partner are incubated with biotinylated polypeptides. Incubation periods are typically at least one hour in duration to ensure sufficient binding. The resulting mixture then is passed through a column packed with avidin-coated beads, whereby the high affinity of biotin for avidin provides binding of the desired cells to the beads. Procedures for using avidin-coated beads are known (see Berenson, et al. *J. Cell. Biochem.*, 10D:239, 1986). Washing to remove unbound material, and the
20 release of the bound cells, are performed using conventional methods. In some instances, the above methods for screening for or identifying binding partners may also be used or modified to isolate or purify such binding partner molecules or cells expressing them. Alternatively, these same assays can be used to detect Thypin binding partners in cell extracts.

Measuring Biological Activity. Thypin polypeptides also find use in measuring the biological
25 activity of Thypin-binding polypeptides in terms of their binding affinity. The polypeptides thus can be employed by those conducting "quality assurance" studies, e.g., to monitor shelf life and stability of polypeptide under different conditions. For example, the polypeptides can be employed in a binding affinity study to measure the biological activity of a binding partner polypeptide that has been stored at different temperatures, or produced in different cell types. Thypin polypeptides also can be used to
30 determine whether biological activity is retained after modification of a binding partner polypeptide (e.g., chemical modification, truncation, mutation, etc.). The binding affinity of the modified polypeptide is compared to that of an unmodified binding polypeptide to detect any adverse impact of the modifications on biological activity of the binding polypeptide. The biological activity of a binding polypeptide thus can be ascertained before it is used in a research study, for example.

Carriers and Delivery Agents. The polypeptides also find use as carriers for delivering agents
35 attached thereto to cells bearing identified binding partners. The polypeptides thus can be used to deliver diagnostic or therapeutic agents to such cells (or to other cell types found to express binding partners on the cell surface) in *in vitro* or *in vivo* procedures. Detectable (diagnostic) and therapeutic agents that can be attached to a polypeptide include, but are not limited to, toxins, other cytotoxic
40 agents, drugs, radionuclides, chromophores, enzymes that catalyze a colorimetric or fluorometric reaction, and the like, with the particular agent being chosen according to the intended application. Among the toxins are ricin, abrin, diphtheria toxin, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, ribosomal

WO 02/072769

46

PCT/US02/07215

- 5 inactivating polypeptides, mycotoxins such as trichothecenes, and derivatives and fragments (e.g., single chains) thereof. Radionuclides suitable for diagnostic use include, but are not limited to, ^{123}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , and ^{76}Br . Examples of radionuclides suitable for therapeutic use are ^{131}I , ^{211}At , ^{77}Br , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{106}Pd , ^{64}Cu , and ^{67}Cu . Such agents can be attached to the polypeptide by any suitable conventional procedure. The polypeptide comprises functional groups on amino acid side
- 10 chains that can be reacted with functional groups on a desired agent to form covalent bonds, for example. Alternatively, the polypeptide or agent can be derivatized to generate or attach a desired reactive functional group. The derivatization can involve attachment of one of the bifunctional coupling reagents available for attaching various molecules to polypeptides (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). A number of techniques for radiolabeling polypeptides are known.
- 15 Radionuclide metals can be attached to polypeptides by using a suitable bifunctional chelating agent, for example. Conjugates comprising polypeptides and a suitable diagnostic or therapeutic agent (preferably covalently linked) are thus prepared. The conjugates are administered or otherwise employed in an amount appropriate for the particular application.

20 Treating Diseases with Thypin Polypeptides and Antagonists Thereof

As shown in Example 6, Thypin mRNA is expressed at relatively high levels in skin. Example 6 shows further that when lung epithelial cells are exposed to a combination of IL-4 and IL-13 prior to RNA analysis, Thypin expression is selectively induced. Certain diseases, including allergies and other lung diseases, are associated with elevated levels of IL-4, IL-13 and other cytokines,

25 and are associated also with elevated levels of various proteases that cause tissue destruction.

Accordingly, one aspect of the invention provides physiologically acceptable compositions containing Thypin for reducing protease levels in patients having a lung disorder. These compositions may be used alone or in conjunction with other medicines or treatments being used to treat the same disorder, and may be administered by injection or aerosol delivery directly to the lungs. Lung disorders

30 that may be treated by administering Thypin include asthma, chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary alveolar proteinosis, bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis, radiation-induced pulmonary fibrosis, cystic fibrosis, collagen accumulation in the lungs, and ARDS. Other pulmonary disorders that may be treated by administering Thypin include chronic obstructive pulmonary disease (COPD) associated with chronic bronchitis or emphysema; fibrotic lung diseases, such as cystic

35 fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis and radiation-induced pulmonary fibrosis; sarcoidosis, including pulmonary sarcoidosis; and allergies, including allergic rhinitis, contact dermatitis, atopic dermatitis, and asthma.

Administration of compositions containing Thypin also may be useful for reducing protease levels in patients suffering from various skin disorders, including but not limited to dermatitis

40 herpetiformis (Dühring's disease), atopic dermatitis, contact dermatitis, urticaria (including chronic idiopathic urticaria), and autoimmune blistering diseases, including pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. For treating skin disorders, the Thypin composition may be administered systemically by

WO 02/072769

47

PCT/US02/07215

5 injection, via aerosol, or topically by local injection, or may be applied directly to the affected area in a lotion, ointment, cream, or gel.

Further, the Thypin polypeptides, fragments, variants, antagonists, agonists, antibodies, and binding partners of the invention are potentially useful for preventing, treating and/or diagnosing one or more medical conditions and diseases including, but not limited to those in the following group:

10 psoriasis; eczema; cancers involving breakpoints or deletions in chromosome 18q; squamous cell carcinomas, including carcinoma of lung, cervix and esophagus; arthritis that involves extracellular matrix destruction or formation of lesions in arthritic joints, including osteoarthritis and rheumatoid arthritis; cirrhosis; thrombosis; emphysema; angiodema; tumor growth; disorders involving vascular hemostasis; disorders involving complement activation; disorders associated with abnormal

15 degradation of the extracellular matrix, such as tumor invasion and metastasis; disorders involving digestion; disorders involving control of fibrinolysis; disorders of the coagulation cascade; disorders associated with vasodilation in inflammation and hypertension.

The therapeutic molecule or molecules to be used will depend on the etiology of the condition to be treated and the biological pathways involved, and variants, fragments, and binding partners of

20 Thypin polypeptides may have effects similar to or different from Thypin polypeptides. Molecules useful for manipulating Thypin levels or activities may include full-length Thypin polypeptides or fragments thereof, allelic variants, muteins, antagonists, agonists, antibodies, and binding partners of the invention, and it is understood that a specific molecule or molecules can be selected from those provided as embodiments of the invention by individuals of skill in the art, according to the biological

25 and therapeutic considerations described herein.

Administration of Thypin Polypeptides and Antagonists Thereof

This invention provides compounds, compositions, and methods for treating a patient, preferably a mammalian patient, and most preferably a human patient, who is suffering from a medical disorder, and in particular a Thypin-mediated disorder, such as the disorders described above. Such

30 Thypin-mediated disorders include conditions caused (directly or indirectly) or exacerbated by binding between Thypin and a binding partner. For purposes of this disclosure, the terms "illness," "disease," "medical condition," "abnormal condition" and the like are used interchangeably with the term "medical disorder." The terms "treat", "treating", and "treatment" used herein includes curative, preventative (e.g., prophylactic) and palliative or ameliorative treatment. For such therapeutic uses,

35 Thypin polypeptides and fragments, Thypin nucleic acids encoding Thypin polypeptides, and/or agonists or antagonists of the Thypin polypeptide such as antibodies can be administered to the patient in need through well-known means. Compositions of the present invention can contain a polypeptide in any form described herein, such as native polypeptides, variants, derivatives, oligomers, and biologically active fragments. In particular embodiments, the composition comprises a soluble

40 polypeptide or an oligomer comprising soluble Thypin polypeptides.

Therapeutically Effective Amount. In practicing the method of treatment or use of the present invention, a therapeutically effective amount of a therapeutic agent of the present invention is

5 administered to a patient having a condition to be treated, preferably to treat or ameliorate diseases associated with the activity of a Thypin polypeptide. "Therapeutic agent" includes without limitation any of the Thypin polypeptides, fragments, and variants described herein; nucleic acids encoding Thypin polypeptides, fragments, and variants; agonists or antagonists of Thypin polypeptides such as agonistic or antagonistic antibodies specific for Thypin; Thypin polypeptide binding partners; and
 10 complexes formed from Thypin polypeptides, fragments, variants, and binding partners, etc. As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each therapeutic agent or other active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful patient benefit, i.e., treatment, healing, prevention or amelioration of the relevant medical condition, or an increase in rate of treatment, healing, prevention or amelioration of such conditions.
 15 The therapeutic agents provided herein may be administered in combination with other therapeutic agents, either serially, alternately, or simultaneously.

As used herein, the phrase "administering a therapeutically effective amount" of a therapeutic agent means that the patient is treated with said therapeutic agent in an amount and for a time sufficient to induce an improvement, and preferably a sustained improvement, in at least one indicator that
 20 reflects the severity of the disorder. An improvement is considered "sustained" if the patient exhibits the improvement on at least two occasions separated by one or more days, or more preferably, by one or more weeks. The degree of improvement is determined based on signs or symptoms, and determinations may also employ questionnaires that are administered to the patient, such as quality-of-life questionnaires. Various indicators that reflect the extent of the patient's illness may be assessed for
 25 determining whether the amount and time of the treatment is sufficient. The baseline value for the chosen indicator or indicators is established by examination of the patient prior to administration of the first dose of the therapeutic agent. Preferably, the baseline examination is done within about 60 days of administering the first dose. If the therapeutic agent is being administered to treat acute symptoms, the first dose is administered as soon as practically possible after the injury has occurred. Improvement is
 30 induced by administering therapeutic agents such as Thypin polypeptides or antagonists until the patient manifests an improvement over baseline for the chosen indicator or indicators. In treating chronic conditions, this degree of improvement is obtained by repeatedly administering this medicament over a period of at least a month or more, e.g., for one, two, or three months or longer, or indefinitely. A period of one to six weeks, or even a single dose, often is sufficient for treating acute
 35 conditions or injuries. Although the extent of the patient's illness after treatment may appear improved according to one or more indicators, treatment may be continued indefinitely at the same level or at a reduced dose or frequency. Once treatment has been reduced or discontinued, it later may be resumed at the original level if symptoms should reappear.

Dosing. One skilled in the pertinent art will recognize that suitable dosages will vary,
 40 depending upon such factors as the nature and severity of the disorder to be treated, the patient's body weight, age, general condition, and prior illnesses and/or treatments, and the route of administration. Preliminary doses can be determined according to animal tests, and the scaling of dosages for human

5 administration is performed according to art-accepted practices such as standard dosing trials. For example, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. The dosage will depend on the specific activity of the compound and can be readily determined by routine experimentation. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture, while minimizing toxicities.

10 Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Ultimately, the attending physician will decide the amount of therapeutic agent of the present invention with which to treat each individual patient, and may modulate the dose and frequency of administration in accord with an individual patient's needs.

15 Pharmaceutical compositions comprising Thypin or fragments thereof, a protein that is a Thypin antagonist or a protein that is a Thypin agonist should contain a dose of about 0.01 ng to about 100 mg (preferably about 0.1 ng to about 10 mg, more preferably about 0.1 microgram to about 1 mg) of polypeptide per kg body weight. In one embodiment of the invention, such compositions are administered one time per week to treat the various medical disorders disclosed herein, in another

20 embodiment are administered at least two times per week, and in another embodiment are administered at least three times per week. If injected, the effective amount of Thypin polypeptides or antagonists per adult dose may be calculated based on body surface area, and may involve doses of 1-20 mg/m², and preferably involves doses of 5-12 mg/m². Alternatively, a flat dose may be administered, whose amount may range from 5-100 mg/dose. Exemplary dose ranges for a flat dose to be administered by

25 subcutaneous injection are 5-25 mg/dose, 25-50 mg/dose and 50-100 mg/dose. In one embodiment of the invention, a medical disorder is treated by administering a preparation acceptable for injection containing Thypin polypeptides at a flat dose containing 1, 5, 10, 25 or 50 mg. The 1, 5, 10, 25 or 50 mg dose may be administered repeatedly, particularly for chronic conditions. If a route of administration other than injection is used, the dose is appropriately adjusted in accord with standard

30 medical practices.

The frequency of administration and duration of the treatment may vary. In many instances, an improvement in a patient's condition will be obtained by injecting the therapeutic dose of Thypin polypeptides or Thypin antagonists one to three times per week over a period of at least three weeks, or alternatively, one or two times per week for at least three weeks, though treatment for longer periods

35 may be necessary to induce the desired degree of improvement. For incurable chronic conditions, the regimen may be continued indefinitely, with adjustments being made to dose and frequency if such are deemed necessary by the patient's physician. The foregoing doses are examples for an adult patient who is a person who is 18 years of age or older.

For pediatric patients (age 4-17), one suitable regimen involves the subcutaneous injection of

40 0.4 mg/kg, up to a maximum dose of 25 mg of Thypin polypeptides or antagonists, administered by subcutaneous injection one or more times per week. If an antibody against a Thypin polypeptide is used as the Thypin polypeptide antagonist, a preferred dose range is 0.1 to 20 mg/kg, and more

5 preferably is 1-10 mg/kg. Another preferred dose range for an anti-Thypin antibody is 0.75 to 7.5 mg/kg of body weight. Humanized antibodies are preferred, that is, antibodies in which only the antigen-binding portion of the antibody molecule is derived from a non-human source. Such antibodies may be injected or administered intravenously.

10 Formulations. Compositions comprising an effective amount of a Thypin polypeptide of the present invention (from whatever source derived, including without limitation from recombinant and non-recombinant sources), in combination with other components such as a physiologically acceptable diluent, carrier, or excipient, are provided herein. The term "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). Formulations suitable for administration include aqueous and non-aqueous sterile
15 injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The polypeptides can be formulated according to known methods used to prepare pharmaceutically useful compositions. They can be combined in admixture, either as the sole active material or with other known active materials suitable
20 for a given indication, with pharmaceutically acceptable diluents (e.g., saline, Tris-HCl, acetate, and phosphate buffered solutions), preservatives (e.g., thimerosal, benzyl alcohol, parabens), emulsifiers, solubilizers, adjuvants and/or carriers. Suitable formulations for pharmaceutical compositions include those described in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed. 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA. In addition, Thypin for pharmaceutical compositions can be complexed with polyethylene
25 glycol (PEG), metal ions, or incorporated into polymeric compounds such as polyacetic acid, polyglycolic acid, hydrogels, dextran, etc., or incorporated into liposomes, microemulsions, micelles, unilamellar or multilamellar vesicles, erythrocyte ghosts or spheroblasts. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within
30 the level of skill in the art, as disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 4,235,871; U.S. Pat. No. 4,501,728; U.S. Pat. No. 4,837,028; and U.S. Pat. No. 4,737,323. Such compositions will influence the physical state, solubility, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance, and are thus chosen according to the intended application, so that the characteristics of the carrier will depend on the selected route of administration. In one preferred embodiment of the invention, sustained-release
35 forms of Thypin polypeptides are used. Sustained-release forms suitable for use in the disclosed methods include, but are not limited to, Thypin polypeptides that are encapsulated in a slowly-dissolving biocompatible polymer (such as the alginate microparticles described in U.S. No. 6,036,978), admixed with such a polymer (including topically applied hydrogels), and/or encased in a biocompatible semi-permeable implant.

40 Combinations of Therapeutic Compounds. The invention further provides the administration of Thypin polypeptides, Thypin antagonists or Thypin agonists concurrently with one or more other drugs that are administered to the same patient in combination with the Thypin polypeptides,

5 antagonists or agonists, each drug being administered according to a regimen suitable for that medicament. Generally, the additional drug is one that is effective against the same medical condition for which the Thypin is being administered. "Concurrent administration" encompasses simultaneous or sequential treatment with the components of the combination, as well as regimens in which the drugs are alternated, or wherein one component is administered long-term and the other(s) are administered
10 intermittently. Components may be administered in the same or in separate compositions, and by the same or different routes of administration. The pharmaceutical composition may further contain other agents which either enhance the activity of the Thypin polypeptide or complement its activity or use in treatment. Such additional factors and/or agents may be included in the pharmaceutical composition to produce a synergistic effect with a polypeptide of the invention, or to minimize side effects.
15 Conversely, a Thypin polypeptide, antagonist or agonist of the present invention may be included in formulations of the particular cytokine, lymphokine, chemokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or anti-thrombotic factor, or anti-inflammatory agent to minimize side effects of the cytokine, lymphokine, chemokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or anti-thrombotic factor, or anti-inflammatory agent. Additional examples of drugs to be administered concurrently may include
20 but are not limited to analgesics, corticosteroids, antagonists of inflammatory cytokines, non-steroidal anti-inflammatories, pentoxifylline, thalidomide, and disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as azathioprine, cyclophosphamide, cyclosporine, hydroxychloroquine sulfate, methotrexate, leflunomide, minocycline, penicillamine, sulfasalazine and gold compounds such as oral gold, gold sodium thiomalate, and aurothioglucose. Additionally, Thypin polypeptides or antagonists
25 may be combined with a second Thypin polypeptide/antagonist, including an antibody against a Thypin polypeptide, or a Thypin polypeptide-derived peptide that acts as a competitive inhibitor of a native Thypin polypeptide.

Routes of Administration. Any efficacious route of administration may be used to therapeutically administer Thypin polypeptides or antagonists thereof, including those compositions comprising nucleic acids. Parenteral administration includes injection, for example, via intra-articular,
30 intravenous, intramuscular, intralesional, intraperitoneal or subcutaneous routes by bolus injection or by continuous infusion., and also includes localized administration, e.g., at a site of disease or injury. Other suitable means of administration include sustained release from implants; aerosol inhalation and/or insufflation.; eyedrops; vaginal or rectal suppositories; buccal preparations; oral preparations,
35 including pills, syrups, lozenges or chewing gum; and topical preparations such as lotions, gels, sprays, ointments or other suitable techniques. Alternatively, Thypin polypeptides, antagonists or agonists may be administered by implanting cultured cells that express the polypeptide, for example, by implanting cells that express Thypin polypeptides or proteinaceous antagonists. Cells may also be cultured *ex vivo* in the presence of Thypin polypeptides in order to modulate their proliferation or to
40 produce a desired effect on or activity in such cells. Treated cells can then be introduced *in vivo* for therapeutic purposes.

5 In another embodiment, the patient's own cells are induced to produce Thypin polypeptides or antagonists by transfection *in vivo* or *ex vivo* with a DNA that encodes Thypin polypeptides or antagonists. This DNA can be introduced into the patient's cells, for example, by injecting naked DNA or liposome-encapsulated DNA that encodes Thypin polypeptides or antagonists, or by other means of transfection. Nucleic acids of the invention may also be administered to patients by other known
10 methods for introduction of nucleic acid into a cell or organism (including, without limitation, in the form of viral vectors or naked DNA). When Thypin polypeptides or antagonists are administered in combination with one or more other biologically active compounds, these may be administered by the same or by different routes, and may be administered simultaneously, separately or sequentially.

Oral Administration. When a therapeutically effective amount of a therapeutic agent of the present invention is administered orally, polypeptide of the present invention will be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, the pharmaceutical composition of the invention may additionally contain a solid carrier such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% polypeptide of the present invention, and preferably from about 25 to 90% polypeptide of the present invention. When administered in liquid
20 form, a liquid carrier such as water, ethanol, petroleum, oils of animal or plant origin such as peanut oil, mineral oil, soybean oil, or sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5 to 90% by weight of polypeptide of the present invention, and preferably from about 1 to 50% polypeptide of the present
25 invention.

Administration by Injection. For therapeutic agents comprising polypeptides, injection is one of the preferred routes of administration. When a therapeutically effective amount of polypeptide of the present invention is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, polypeptide of
30 the present invention will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable polypeptide solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition to polypeptide of the present invention, an isotonic vehicle such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Dextrose
35 Injection, Dextrose and Sodium Chloride Injection, Lactated Ringer's Injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition of the present invention may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additives known to those of skill in the art. The duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention will vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and potential idiosyncratic
40 response of each individual patient. It is contemplated that the duration of each application of the polypeptide of the present invention will be in the range of 12 to 24 hours of continuous intravenous

5 administration. Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention.

Bone and Tissue Administration. For compositions of the present invention which are useful for bone, cartilage, tendon or ligament disorders, the therapeutic method includes administering the composition topically, systematically, or locally as an implant or device. When administered, the therapeutic composition for use in this invention is, of course, in a pyrogen-free, physiologically acceptable form. Further, the composition may desirably be encapsulated or injected in a viscous form for delivery to the site of bone, cartilage or tissue damage. Topical administration may be suitable for wound healing and tissue repair. Therapeutically useful agents other than a polypeptide of the invention which may also optionally be included in the composition as described above, may alternatively or additionally, be administered simultaneously or sequentially with the composition in the methods of the invention. Preferably for bone and/or cartilage formation, the composition would include a matrix capable of delivering the polypeptide-containing composition to the site of bone and/or cartilage damage, providing a structure for the developing bone and cartilage and optimally capable of being resorbed into the body. Such matrices may be formed of materials presently in use for other implanted medical applications. The choice of matrix material is based on biocompatibility, biodegradability, mechanical properties, cosmetic appearance and interface properties. The particular application of the compositions will define the appropriate formulation. Potential matrices for the compositions may be biodegradable and chemically defined calcium sulfate, tricalciumphosphate, hydroxyapatite, polylactic acid, polyglycolic acid and polyanhydrides. Other potential materials are biodegradable and biologically well-defined, such as bone or dermal collagen. Further matrices are comprised of pure polypeptides or extracellular matrix components. Other potential matrices are nonbiodegradable and chemically defined, such as sintered hydroxyapatite, bioglass, aluminates, or other ceramics. Matrices may be comprised of combinations of any of the above mentioned types of material, such as polylactic acid and hydroxyapatite or collagen and tricalciumphosphate. The bioceramics may be altered in composition, such as in calcium-aluminate-phosphate and processing to alter pore size, particle size, particle shape, and biodegradability. Presently preferred is a 50:50 (mole weight) copolymer of lactic acid and glycolic acid in the form of porous particles having diameters ranging from 150 to 800 microns. In some applications, it will be useful to utilize a sequestering agent, such as carboxymethyl cellulose or autologous blood clot, to prevent the polypeptide compositions from disassociating from the matrix. A preferred family of sequestering agents is cellulosic materials such as alkylcelluloses (including hydroxyalkylcelluloses), including methylcellulose, ethylcellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropyl-methylcellulose, and carboxymethyl-cellulose, the most preferred being cationic salts of carboxymethylcellulose (CMC). Other preferred sequestering agents include hyaluronic acid, sodium alginate, poly(ethylene glycol), polyoxyethylene oxide, carboxyvinyl polymer and poly(vinyl alcohol). The amount of sequestering agent useful herein is 0.5-20 wt %, preferably 1-10 wt % based on total formulation weight, which represents the amount necessary to prevent desorption of the polypeptide from the polymer matrix and to provide appropriate handling of

5 the composition, yet not so much that the progenitor cells are prevented from infiltrating the matrix, thereby providing the polypeptide the opportunity to assist the osteogenic activity of the progenitor cells.

In further compositions, polypeptides of the invention may be combined with other agents beneficial to the treatment of the bone and/or cartilage defect, wound, or tissue in question. These agents include various growth factors such as epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta), and insulin-like growth factor (IGF). The dosage regimen of a polypeptide-containing pharmaceutical composition to be used in tissue regeneration will be determined by the attending physician considering various factors which modify the action of the polypeptides, e.g., amount of tissue weight desired to be formed, the site of damage, the condition of the damaged tissue, the size of a wound, type of damaged tissue (e.g., bone), the patient's age, sex, and diet, the severity of any infection, time of administration and other clinical factors. The dosage may vary with the type of matrix used in the reconstitution and with inclusion of other polypeptides in the pharmaceutical composition. For example, the addition of other known growth factors, such as IGF I (insulin like growth factor I), to the final composition, may also effect the dosage. Progress can be monitored by periodic assessment of tissue/bone growth and/or repair, for example, X-rays, histomorphometric determinations and tetracycline labeling.

Veterinary Uses. In addition to human patients, Thypin polypeptides and antagonists are useful in the treatment of disease conditions in non-human animals, such as pets (dogs, cats, birds, primates, etc.), domestic farm animals (horses, cattle, sheep, pigs, birds, etc.), or any animal that suffers from a condition involving aberrant Thypin expression. In such instances, an appropriate dose may be determined according to the animal's body weight. For example, a dose of 0.2-1 mg/kg may be used. Alternatively, the dose is determined according to the animal's surface area, an exemplary dose ranging from 0.1-20 mg/m², or more preferably, from 5-12 mg/m². For small animals, such as dogs or cats, a suitable dose is 0.4 mg/kg. In a preferred embodiment, Thypin polypeptides or antagonists (preferably constructed from genes derived from the same species as the patient), is administered by injection or other suitable route one or more times per week until the animal's condition is improved, or it may be administered indefinitely.

Manufacture of Medicaments. The present invention also relates to the use of Thypin polypeptides, fragments, and variants; nucleic acids encoding Thypin polypeptides, fragments, and variants; agonists or antagonists of the Thypin polypeptides such as antibodies; Thypin polypeptide binding partners; complexes formed from Thypin polypeptides, fragments, variants, and binding partners, etc. in the manufacture of a medicament for the prevention or therapeutic treatment of each medical disorder disclosed herein.

Variations of Thypin polypeptides are provided as naturally occurring genomic variants of the Thypin sequences disclosed herein; such variations may be incorporated into a Thypin polypeptide or nucleic acid individually or in any combination, or in combination with alternative splice variation as described above.

WO 02/072769

55

PCT/US02/07215

5

The following examples are intended to illustrate particular embodiments and not to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1

Identification a New Member of the Human Serpin Family

10 A new serpin gene was identified and sequenced as described below. A nucleotide sequence encoding this newly discovered protein is shown in SEQ ID NO:1. This new serpin gene was named "Thypin" because it appears to be expressed primarily in epithelial tissues (see Example 2 below).

Thypin was discovered as follows. A data set was received from Celera Genomics (Rockville, Maryland) containing a listing of amino acid sequences predicted to be encoded by the human genome. 15 This data set was searched with a BLAST algorithm to identify serpin family polypeptides. IMX96867, located in R22 genomic contig 51804590, was recognized as being exon 1 of a new serpin gene. Two other serpin gene fragments, IMX96869 and IMX96874, were found to contain exons 3 and 6 of the same new serpin gene. These three exons were found to be contiguous on R22 genomic contig 51804590. Three other contiguous Thypin exons (exons 4, 5 and 7) were identified by electronic 20 genome walking with SCCA-2 cDNA sequence on this same contig. Exon 2 was discovered by sequencing a thymus cDNA. Exon 2 was confirmed by determining that it was located between exons 1 and 3 on R22 genomic contig 51804590.

Using thymus cDNA as template, the complete coding sequence of this new serpin was determined by reverse transcriptase-PCR cloning and sequencing. This effort employed the following 25 oligonucleotides that were designed to the 5' and 3' untranslated regions of Thypin:

SEQ ID NO:3: 5' TGGTTTATAGATCGTTATAAGTTTAC 3'

SEQ ID NO:4: 5' CTCCAGCTCCAAAGTACTAGACACTGCTCC 3'

The two oligonucleotides described above were used as PCR primers to amplify cDNA corresponding to transcripts from human thymus. Using the nested primers shown below, another round of PCR was 30 used to amplify the Thypin cDNA from the initiator methionine to the termination codon. These nested primers had the following sequences:

SEQ ID NO:5: 5' ATACTAGTAGTATGGACTCTCTTGTACAGCAAACACC 3'

SEQ ID NO:6:

5' TAGCGGCCGCTTAAGGAGAGCAGACCCCTGCCATAAAAGAG 3'

35 The following additional PCR primers also were used to generate cDNA encoding exons 1, 2 and 3 of Thypin.

SEQ ID NO:7: 5' ATGGACTCTCTTGTACAGC 3'

SEQ ID NO:8: 5' CTCTCCATAAAGCCTGTTGG 3'

40 Sequence derived from the PCR studies confirmed the Thypin exon sequences that had initially been identified in R22 genomic contig 51804590. Exon 2 was identified in a PCR product spanning exons 1 and 3.

WO 02/072769

56

PCT/US02/07215

5 The gene structure of Thypin was determined by comparing the cDNA sequence shown in SEQ ID NO:1 with the R22 genomic contig 51804590. The Thypin gene was found also to be present in Genomic Contig GenBank Accession No. AC015536. The approximate positions of the exons containing Thypin coding sequence in the AC015536 contig are shown in Table 1 below, as well as the corresponding locations of these nucleotides in SEQ ID NO:1. Table 1 also indicates which amino acids are encoded by each of the seven Thypin exons.

TABLE 1

Exon	AC015536 nts	SEQ ID NO:1 nts	Splice Site @	nt	AA
1	154946-154779	1-168	3'	168	56
2	152744-152610	169-303	5', 3'	135	45
3	151497-151357	304-444	5', 3'	141	47
4	149980-149862	445-562	5', 3'	118	39.33
5	147080-146935	563-705	5', 3'	143	47.67
6	145597-145430	706-873	5', 3'	168	56
7	144431-144026	874-1278	5'	405	134

The coding region of the Thypin gene includes 7 exons and 6 introns spanning a distance of approximately 10,900 nucleotides on the AC015536 contig. The complete open reading frame of Thypin consists of 1275 nucleotides and encodes a protein containing 425 amino acids (SEQ ID NOS:1 and 2). Each intron has a consensus splice site at its 5' and 3' boundaries. It is possible that the 5' and 3' untranslated regions of the Thypin gene may extend further along the contig sequence beyond those portions that correspond to the 5' and 3' ends as indicated in Table 1.

The amino acid sequence of Thypin (SEQ ID NO:2) was compared with the amino acid sequences of other serpin family members. The alignments were performed using the GCG "pretty" multiple sequence alignment program, with amino acid similarity scoring matrix = blosum62, gap creation penalty = 8, and gap extension penalty = 2. Several of the serpins most closely related to Thypin were LEI (SEQ ID NO:9), PAI2 (SEQ ID NO:10), SERPINB10 (SEQ ID NO:11), SCCA-1 (SEQ ID NO:12), SCCA-2 (SEQ ID NO:13), and prostapin (SEQ ID NO:14). The sources of the LEI, PAI2, SERPINB10, SCCA-1, SCCA-2 and prostapin sequences in Table 2, respectively, were: SwissProt No. P30740; GenBank No. XP_008746; GenBank No. NP_005015; SwissProt No. P29508; SwissProt No. P48594; and GeneSeq No. Y15156. In Table 2, to facilitate the alignment the prostapin insert of amino acids 207-430 of SEQ ID NO:14 has been omitted from the displayed alignment. Table 2 includes consensus residues that are identical among at least five of the amino acid sequences in the alignment. The capitalized residues in Table 2 are those which match the consensus residues. The numbering of amino acid residues in Table 2 corresponds to the position of those residues in the Thypin amino acid sequence (SEQ ID NO:2).

TABLE 2

— : facultative secretion signal (amino acids 28-42 of SEQ ID NO:2)

- 10

[illegible]

WO 02/072769

58

PCT/US02/07215

THYPIN (2)	aeTvIVLVNA vYFkKwety FdhenTvdaP PclNanenK. .svkMMtQkg
Prstpn (14)	pssvmVLVNA iYFKGQWqnk FqvreTvksP FqlseAqgKn vtVeMMYQlg
consensus	--T--VLVNA -YFKG-W-- F---T---P F--N---K- --V-MM-Q--
	249 297
LEI (9)	kfaygyiedl kcrvLElPY. qGeelSMvIL LPddiedest GLkkiEqIT
PAI2 (10)	klngyiedl kAgILElPY. aG.dvSMfIL LPdeiadvst GLellEseiT
SERP10 (11)	klhifhiExp kAvGLqlyY. ksrDLsllIL LPedi....n GLegLEkaiT
SCCA-1 (12)	sfhfasiEdv qAkVLEiPY. kGkdLSMivL LP....neid GLqLEekIT
SCCA-2 (13)	sfhfaliEdv qAkVLEiPY. kGkdLSMivL LP....neid GLqLEekIT
THYPIN (2)	lyrigfiEev kAgILEmrYt kGk.LSMfvL LPshskdnkL GLeLErkiT
Prstpn (14)	tfklafvkep qmgvLElPYv nnk.LSMiIL LPvgian... .Lkqiekqln
consensus	-----E-- -A--LE-PY- -G--LSM--L LP----- GL--LE---T
	298 347
LEI (9)	lEKLhEWtKp eNldGfievNv sLPRFKLEs YtLnSdLarL GvqDlFNssk
PAI2 (10)	ydKLnkWTSk dkMaBdeVev yiPgFKLEeh YelrSiLrEM GmeDaFNkgr
SERP10 (11)	yEKLnEWTsA dmWelyeVql hLpKFKLEdS YdLkStLssM GmsDaFsqsk
SCCA-1 (12)	aEKLMEWTSI qNMrEtrvdl hLPRFKvEeS YdLkdtLrtM GmvDiFNgd.
SCCA-2 (13)	aEKLMEWTSI qNMrEtrvdl hLPRFKvEeS YdLkdtLrtM GmvniFNgd.
THYPIN (2)	yEKmvaWsS eNMsEesVvl sFPRFtLEdS YdLnSILqdm GitDiFdetr
Prstpn (14)	sgtFhEWTsS sNMnEreVev hLPRFKLEtk YelNslLksl GvtDlFNqvk
consensus	-EKL-EWTS- -NM-E--V-- -LPRFKLE-S Y-L-S-L--M G--D-FN---
	348 396
LEI (9)	ADLSGMSgar difiskivHK sFVEVnEEGT EAAATagla tfCmlmp.ee
PAI2 (10)	AnfSGMSern dLflSevfHq amVdVnEEGT EAAAgTggvm tgRtghg.gp
SERP10 (11)	ADfSGMSsar nLflSnvfhK aFVEinEqGT EAAAgsgsei dirirvp.si
SCCA-1 (12)	ADLSGMTgsr gLvsSgvlHK aFVEVtEEGA EAAATavvv fgSspastne
SCCA-2 (13)	ADLSGMTwsh gLvsSkvlHK aFVEVtEEGv EAAATavvv velSspastne
THYPIN (2)	ADLTGispep nLyLskaiHK tFVEVdRnGT qAAATgavv seRslrsw.v
Prstpn (14)	ADLSGMSptk gLyLskaiHK syldVsEEGT EAAATgdsi avkslp.mra
consensus	ADLSGMS--- -L-LS---HK -FVEV-EEGT EAAAT-----
	397 425
LEI (9)	nFtAdHPFLF FIRHNssgsI LFfGRtsSP
PAI2 (10)	qFvAdHPFLF lImHkITNcI LFfGRtsSP
SERP10 (11)	eFnANHPFLF FIRHNkTNcI LFyGRtsSP
SCCA-1 (12)	eFhcNHPFLF FIRgNkTNsI LFyGRtsSP
SCCA-2 (13)	eFccNHPFLF FIRgNkTNsI LFyGRtsSP
THYPIN (2)	eFnANHPFLF FIRHNkTqCI LFyGRvcSP
Prstpn (14)	qFkANHPFLF FIRHthTNcI LFcGklaSP
consensus	-F-ANHPFLF FIRHN-TN-I LF-GR--SP

5

The closest match found with Thypin among the known serpins in the public databases was SCCA-2. A GAP alignment was performed comparing the Thypin amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and the SCCA-2 amino acid sequence, which is given in SEQ ID NO:13. This GAP comparison employed the BLOSUM62 amino acid substitution matrix, and used a gap weight of 8 and a length weight of 2. The results of this alignment indicated that the SCCA-2 and Thypin polypeptides have a 59.28 % similarity and a 51.03 % identity.

10

Amino acid substitutions and other alterations (deletions, insertions, etc.) to Thypin amino acid sequences (e.g. SEQ ID NO:2) are predicted to be more likely to alter or disrupt Thypin

WO 02/072769

59

PCT/US02/07215

5 polypeptide activities if they result in changes to the capitalized residues of the amino acid sequences as shown in Table 2, and particularly if those changes do not substitute an amino acid of similar structure (such as substitution of any one of the aliphatic residues - Ala, Gly, Leu, Ile, or Val - for another aliphatic residue), or a residue present in other serpin polypeptides at that conserved position. Conversely, if a change is made to a Thypin amino acid sequence resulting in substitution of the
 10 residue at that position in the alignment from one of the other Table 2 serpin polypeptide sequences, it is less likely that such an alteration will affect the function of the altered Thypin polypeptide. For example, the consensus residue corresponding to amino acid 382 of Thypin in Table 2 is alanine, but PAI2 and SERPINB10 have a glycine at that position. Thus, substitution of glycine for the alanine at position 382 of Thypin is less likely to alter the function of the polypeptide than substitution of a very
 15 different amino acid such as proline, tryptophan or tyrosine.

In addition, a partial human cDNA clone (AA242969) was identified in the GenBank dbEST database that has 95% identity to amino acids 69-250 of the Thypin polypeptide shown in SEQ ID NO:2. This region of Thypin includes the above-discussed Thypin insertion, which is located at amino acids 61-107 of SEQ ID NO:2. The region of Thypin corresponding to amino acids 108-373 of SEQ ID
 20 NO:2 corresponds to the ov-serpin structural core, as discussed above, thus this EST polypeptide partially overlaps the Thypin structural core region. This EST protein differs from Thypin at eight amino acid residues, thus suggesting that EST AA242969 may represent a segment of an allelic variant of Thypin. Alternatively, one or more of these eight differences may be due to sequencing errors in determining the corresponding EST cDNA sequence. The locations of these eight differences
 25 correspond to amino acids 109, 115, 118, 126, 127, 216, 246 and 248 of SEQ ID NO:2. The amino acids present in the EST at those locations are, respectively, threonine, asparagine, lysine, phenylalanine, arginine, isoleucine, proline and phenylalanine, whereas in Thypin the corresponding amino acids, respectively, are serine, tyrosine, glutamine, isoleucine, lysine, lysine, glutamine and tyrosine. The polypeptide predicted by EST AA242969 lacks an RSL, thus cannot fold into a serpin
 30 structure nor can it exhibit any bioactivity associated with the Thypin RSL.

EXAMPLE 2

Expression in Cells and Tissues of Thypin mRNA

Oligonucleotides based on the Thypin coding sequences were used in reverse transcriptase PCR reactions to amplify panels of cDNA to determine the expression profile of Thypin. For this
 35 purpose, a pair of oligonucleotide PCR primers (SEQ ID NO:7 and SEQ ID NO:8) were used that amplify exons 1, 2 and 3. These oligonucleotides were used to amplify the Celera panel of cDNAs (Bill Lawrence, VM). By analyzing the reverse transcriptase PCR products, Thypin expression was detected in a wide variety of fetal cells and adult cells, including the following: bronchial epithelium; prostate epithelium; breast epithelium; and small airway epithelium. In addition, Thypin is expressed
 40 in the following epithelial tissues: prostate; testis; thymus; tonsil; skin; keratinocytes; cervix; fetal small intestine; and esophagus. In addition, Thypin is expressed in the following carcinoma and transformed cell lines: lung epithelial carcinoma (A549); B cell lymphoma (Akata, Nalm6, Namalwa);

WO 02/072769

60

PCT/US02/07215

- 5 cancer cells of monocytic origin (U937, Thp-1, AML5); tumor xenografts (colon, pancreas, prostate).
Thypin expression also was observed in miscellaneous tumors originating from lung and esophagus.

EXAMPLE 3**Host Cells Expressing Recombinant Thypin**

- To express Thypin protein, the full-length Thypin cDNA was PCR amplified with SpeI (5')
10 and NotI (3') restriction endonuclease sites using oligonucleotide primers corresponding to SEQ ID NOs
5 and 6. The Thypin gene was cloned into an intermediate cloning vector, placing the gene
downstream of the IgKappa signal sequence, a short FLAG® tag (DYKD), and a poly-HIS tag. This
entire fusion construct was subcloned into pDC412 as a Sall-NotI fragment. The amino acids GTSS
15 were used as a spacer between the poly-HIS and the Thypin coding sequences. The IgKappa signal
was included to direct the expressed protein into the extracellular compartment, that is, to ensure
secretion of the expressed Thypin. The amino acid sequence of the fusion construct up to the initiator
methionine of Thypin is shown as follows:

METDTLLWVLLWVPGSTGDYKDEGSHHHHHGTSS-Thypin

- The 37-amino-acid N-terminal fusion construct sequence shown at the left above is provided as SEQ
20 ID NO:15. This pDC412-Thypin plasmid was transfected into COS-1 monkey kidney cells for
expression of secreted Thypin polypeptide.

- Transfected cell lysates and supernatants will be harvested, purified and analyzed for Thypin
expression by conventional methods including, but not limited to, centrifugation, size exclusion
filtration and chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography, SDS-PAGE,
25 isoelectric focusing, two-dimensional electrophoresis, western blot analysis, radionuclide labeling,
affinity-tag labeling, immunoprecipitation and affinity-tag precipitation. Purified protein can be
examined for post-translational modification, including phosphorylation and glycosylation. Purified
protein will be tested for heat and denaturation-resistant complex formation with a variety of proteases.
The inhibitory activity of Thypin may be stabilized or augmented by the addition of cofactors such as
30 polysulfated oligosaccharides as discussed in Potempa et al. (1994).

EXAMPLE 4**Monoclonal Antibodies That Bind Polypeptides of the Invention**

- This example illustrates a method for preparing monoclonal antibodies that bind Thypin
polypeptides. Other conventional techniques may be used, such as those described in U.S. Patent
35 4,411,993. Suitable immunogens that may be employed in generating such antibodies include, but are
not limited to, purified Thypin polypeptide, an immunogenic fragment thereof, and cells expressing
high levels of Thypin polypeptide or an immunogenic fragment thereof. Immunogenic fragments
generally contain at least 12 or more amino acids. DNA encoding a Thypin polypeptide can also be
used as an immunogen, for example, as reviewed by Pardoll and Beckerleg in *Immunity* 3: 165, 1995.

- 40 Rodents (BALB/c mice or Lewis rats, for example) are immunized with Thypin polypeptide
immunogen emulsified in an adjuvant (such as complete or incomplete Freund's adjuvant, alum, or

WO 02/072769

61

PCT/US02/07215

5 another adjuvant, such as Ribi adjuvant R700 (Ribi, Hamilton, MT)), and injected in amounts ranging from 10-100 µg subcutaneously or intraperitoneally. DNA may be given intradermally (Raz et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519) or intramuscularly (Wang et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156); saline has been found to be a suitable diluent for DNA-based antigens. Ten days to three weeks days later, the immunized animals are boosted with additional immunogen and periodically

10 boosted thereafter on a weekly, biweekly or every third week immunization schedule.

Serum samples are periodically taken by retro-orbital bleeding or tail-tip excision to test for Thypin polypeptide antibodies by dot-blot assay, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), immunoprecipitation, or other suitable assays, such as FACS analysis of inhibition of binding of Thypin polypeptide to a Thypin polypeptide binding partner. Following detection of an appropriate antibody titer, positive animals are provided one last intravenous injection of Thypin polypeptide in

15 saline. Three to four days later, the animals are sacrificed, and spleen cells are harvested and fused to a murine myeloma cell line, e.g., NS1 or preferably P3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580). These cell fusions generate hybridoma cells, which are plated in multiple microtiter plates in a HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine) selective medium to inhibit proliferation of non-fused cells,

20 myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

The hybridoma cells may be screened by ELISA for reactivity against purified Thypin polypeptide by adaptations of the techniques disclosed in Engvall et al., (*Immunochem.* 8: 871, 1971) and in U.S. Patent 4,703,004. A preferred screening technique is the antibody capture technique described in Beckmann et al., (*J. Immunol.* 144: 4212, 1990). Thypin-specific antibodies will bind

25 Thypin but not other serpins including SCCA-1, SCCA-2, hurpin, prostapin, bomapin, PAI2 or LEI. Hybridoma cells producing Thypin-specific antibodies can be injected intraperitoneally into syngeneic rodents to produce ascites containing high concentrations (for example, greater than 1 milligram per milliliter) of anti-Thypin polypeptide monoclonal antibodies. Alternatively, hybridoma cells can be grown *in vitro* in flasks or roller bottles by various techniques. Monoclonal antibodies can be purified

30 by ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can also be used, as can affinity chromatography based upon binding to Thypin polypeptide.

EXAMPLE 5

Chromosome Mapping

35 The Thypin gene was mapped to a human chromosome using the BLAST program on the NCBI Human Genome mapping resource webpage. Results of this BLAST analysis indicated that Thypin is located within the serpin cluster at human chromosome 18q21.3, and that it maps between the hurpin (located at 18q21.3-q22; Spring et al., *Biochem Biophys Res Com* 264:299 (1999)) and maspin genes (Schneider et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3147 (1995)). Serpins that map to 18q21.3

40 include: SerpinB5 (PI-5, maspin); SerpinB13 (PI-13, hurpin, headpin); SerpinB3 (SCCA-1); Serpin B7 (PI-11, megsin); Serpin B2 (PAI-2); Serpin B10 (PI-10, bomapin); and SerpinB8 (PI-8, CAP2). These

WO 02/072769

62

PCT/US02/07215

- 5 serpins, listed in consecutive order distal to the centromere, are located on NCBI human genomic 18q contig NT_010986.2.

EXAMPLE 6

Analysis of Thypin Expression by Real-Time Quantitative PCR

- 10 RNA samples were obtained from a variety of tissue sources and from cells or tissues treated with a variety of compounds; these RNA samples included commercially available RNA (Ambion, Austin, TX; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA; and Stratagene, La Jolla, CA). The RNA samples were DNase treated (part # 1906, Ambion, Austin, TX), and reverse transcribed into a population of cDNA molecules using TaqMan Reverse Transcription Reagents (part # N808-0234, Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturers instructions using random hexamers.
- 15 Each population of cDNA molecules was placed into specific wells of a multi-well plate at either 5ng or 20ng per well and run in triplicate. Pooling was used when same tissue types and stimulation conditions were applied but collected from different donors. Negative control wells were included in each multi-well plate of samples.
- 20 Sets of probes and oligonucleotide primers complementary to mRNAs encoding Thypin polypeptides were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA) and synthesized, and PCR conditions for these probe/primer sets were optimized to produce a steady and logarithmic increase in PCR product every thermal cycle between approximately cycle 20 and cycle 36. The forward primer used was
- 25 5' - AACGACAGAGCCTCTGGATCAG - 3' (SEQ ID NO:16)
at a concentration of 900 nM; the reverse primer used was
5' - GAGAAGCTGCCAAAGTAGCA - 3' (SEQ ID NO:17)
at a concentration of 300nM. The FAM-labeled probe used for Thypin was
5' - CAGTCCGCTCTCATTGTTTAAGGACCCAG - 3' (SEQ ID NO:18)
- 30 at a concentration of 200 nM. Oligonucleotide primer sets complementary to 18S RNA and to mRNAs encoding certain 'housekeeper' proteins - beta-actin, HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase), DHFR (dihydrofolate reductase), PKG (phosphoglycerate kinase), and GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) - were synthesized and PCR conditions were optimized for these primer sets also. For example, forward and reverse primer concentrations for the housekeeping gene HPRT was
- 35 300nM each, and VIC labeled probe (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used at 200nM. Multiplex TAQMAN PCR reactions using both Thypin and HPRT probe/primer sets were set up in 25-microliter volumes with TAQMAN Universal PCR Master Mix (part # 4304437, Applied Biosystems, Foster City, CA) on an Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System. Threshold cycle values (C_T) were determined using Sequence Detector software version 1.7a (Applied Biosystems,
- 40 Foster City, CA), and delta C_T (the average FAM value minus the average VIC value) was calculated and transformed to $2E(-\Delta C_T)$, which is 2 to the minus delta C_T , for relative expression comparison of Thypin to HPRT.

WO 02/072769

63

PCT/US02/07215

- 5 Analysis of Thypin expression relative to HPRT expression in a variety of adult and fetal RNA samples indicated that Thypin is expressed less abundantly than HPRT in a few adult and fetal tissues, with the lowest relative expression in adult testes and uterus (see below); a ratio of 0.00710639 indicates that the expression of Thypin is less than 1% of that of HPRT. In contrast, Thypin is expressed about 28-fold more abundantly than HPRT in adult skin.

10

Sample	Thypin Avg CT	HPRT Avg CT	Ratio of Thypin: HPRT	Minimum (Minus Err)	Maximum (Plus Err)
Adult Testis	34.3867	27.25	0.00710639	0.00624469	0.008087
Adult Uterus	32.9067	30.067	0.13966089	0.12738358	0.1531215
Adult Thymus	31.8633	30.393	0.3609823	0.33180107	0.39273
Fetal Colon	31.56	30.103	0.36433395	0.3287549	0.4037635
Fetal Skeletal Muscle	31.73	30.407	0.39961057	0.33446684	0.4774423
Adult Skin	25.1133	29.94	28.3773245	25.9267212	31.05956

Analysis of Thypin expression relative to HPRT expression in RNA samples from human mesenchymal stem cells undergoing differentiation into bone indicated that Thypin expression increases during differentiation, but is still expressed at much lower levels than HPRT (see below).

15

Sample	Thypin Avg CT	HPRT Avg CT	Ratio of Thypin: HPRT	Minimum (Minus Err)	Maximum (Plus Err)
MSC Bone day 0	39.3633	29.053	0	0	0
MSC Bone 24h	35.15	29.24	0.0166308	0.0131106	0.0210961
MSC Bone 1wk	34.8533	29.977	0.034039	0.0311515	0.0371942
MSC Bone 4.5wk	34.9733	30.613	0.0486978	0.0381139	0.0622207

- Thypin expression relative to HPRT expression was analyzed in RNA samples from lung epithelial cells of normal human bronchial tissue ("NHBE") exposed to a variety of cytokine treatments (see below). This experiment shows that treatment with a combination of interleukin-4 (IL-4) and interleukin-13 (IL-13) increased Thypin expression, while treatment with interferon-gamma (IFN γ) or a combination of interleukin-1 (IL-1), interleukin-18 (IL-18), and tumor necrosis factor alpha (TNF α) reduced Thypin expression. Furthermore, the specific upregulation of Thypin by the IL-4 and IL-13 combination was also observed in experiments with primary lung small airway epithelial cells (SAEC) and with lung adenocarcinoma epithelial cells (Calu3). These results suggest that upregulation of the protease inhibitor Thypin may be involved in lung epithelial response to inflammation-induced proteases.

20

25

Sample	Thypin Avg CT	HPRT Avg CT	Ratio of Thypin: HPRT	Minimum (Minus Err)	Maximum (Plus Err)
NHBE no stim	31.4233	29.203	0.2146414	0.1945253	0.2368376
NHBE IL4/IL13	31.11	29.757	0.3913867	0.370097	0.4139011

WO 02/072769

64

PCT/US02/07215

NHBE IL1/IL18/TNF α	32.0967	29.347	0.1486509	0.1268492	0.1741996
NHBE gIFN	33.98	30.167	0.0711332	0.0629347	0.0803997
SAEC no stim	36.9367	29.13	0	0	0
SAEC IL4/IL13	34.5667	29.037	0.0216423	0.0164463	0.02848
SAEC IL1/IL18/TNF α	36.3967	28.533	0	0	0
SAEC IFN γ	38.39	28.987	0	0	0
Calu3 no stim	38.13	28.527	0	0	0
Calu3 IL4/IL13	35.8167	28.88	0.0081631	0.0070136	0.009501
Calu3 IL1/IL18/TNF α	38.21	28.22	0	0	0
Calu3 IFN γ	39.5	28.257	0	0	0

5

EXAMPLE 7

Identification of Mouse Ov-Serpin Genes by Synteny Analysis

We have identified a mouse Thypin homolog and four new mouse ov-serpin genes that are homologous to human SERPINB3, SERPINB4, SERPINB10, and SERPINB13. These mouse genes map to mouse chromosome 1 in a syntenic cluster of ov-serpins with similar organization to human chromosome 18. Figure 1 shows a genetic map of the human chromosome 18 and mouse chromosome 1 ov-serpins showing extensive syntenic organization between the chromosomes. The identification of four new genomic ov-serpin sequences and previously unannotated cDNAs extends the mouse ov-serpin homology on chromosome 1 and completes the orthologous representation of the known human chromosome 18 ov-serpins.

BLAST analysis of public (NT 010986.2) and Celera Genomics (CHGD R26B, GA_X2HTBL3HLMK) genomic scaffolds located Thypin in a contiguous cluster of ten chromosome 18 ov-serpins that span a genomic region of approximately 400 kilobases. The ten ov-serpin genes identified include eight that were annotated in the public domain (SERPINB2, PAI2; SERPINB3, SCCA1; SERPINB4, SCCA2; SERPINB5, Maspin; SERPINB7, Megsin; SERPINB8, P18; SERPINB10, Bomapin; SERPINB13, Hurpin), one found in the Derwent patent database (SERPINB11, Prostatin), and Thypin (see Table 3 for Accession numbers). Using NCBI LocusLink (SERPINB2 and SERPINB4) and BLAST analysis we compiled or identified the best matching (% amino acid identity) homologous mouse cDNAs to seven out of ten of the human chromosome 18 ov-serpins (Table 3). We did not find good mouse cDNA matches for the SERPINB3, SERPINB10, or SERPINB13 in the GenBank database. However, we did find high-identity matches for these three serpins by BLAST searching the mouse genomic database from Celera Genomics. The translated mouse protein matches to SERPINB3, SERPINB10 and SERPINB13 are named Genomicb3, Genomicb10, and Genomicb13, respectively. We also found another mouse genomic sequence that is homologous to SERPINB4 (also SERPINB3 due to their high sequence similarity) which we translated and designated Genomicb4. The predicted protein sequences for mouse Genomicb3, Genomicb4, Genomicb10, and Genomicb13, edited visually at the intron/exon junctions to give the best fit with the human sequence, are provided as SEQ ID NOs 19 through 22, respectively. Only mouse Genomicb4

WO 02/072769

65

PCT/US02/07215

5 (SEQ ID NO:20) and Genomicb13 (SEQ ID NO:22) appear complete. The Genomicb10 mouse protein is missing 25 amino acids of coding sequence at the splice site of exon seven. The Genomicb3 mouse sequence appears to have a stop codon after amino acid 123 of SEQ ID NO:19; whether this is an artifact due to sequencing error is not clear. Each of these mouse serpin polypeptide sequences has a predicted cleavage site in the RSL: between amino acids 352 and 353 of SEQ ID NO:19; between
 10 amino acids 352 and 353 of SEQ ID NO:20; between amino acids 332 and 333 of SEQ ID NO:21; and between amino acids 354 and 355 of SEQ ID NO:22. We have not yet confirmed that any of these putative genes encode cDNAs. However, they are useful as markers in the mouse and human chromosomal ov-serpin cluster analysis discussed below. Unique mouse genomic homologs were identified for all the chromosome 18 ov-serpins except SERPINB3 and SERPINB4. Three cDNAs are
 15 annotated as mouse homologs of SERPINB4 in NCBI LocusLink (AF063937, AK003220 and AK003650) and all are represented, at least partially, in the mouse genome. We could only find an exact genomic match for the first 176 nucleotides of AF063937 on chromosome 1 scaffold CMGD R12C GA_X5J8B7W5VAQ (1,928,040 bp), encoding a complete exon from the initiator methionine to amino acid 56. We identified an exact coding sequence match for AK003220 on mouse chromosome 1
 20 CMGD R12C contig GA_X5J8B7W2TTH (39,633 bp) and most of AK003650 on genomic scaffold CMGD R12C GA_X5J8B7W4D6C (2,012,083 bp). We did not find the first 73 amino acid genomic coding sequence of AK003650. This places three related Serpinb4 mouse homologs in three different chromosome 1 regions that have not yet been linked. With the identification herein of Genomicb3 and Genomicb4 on GA_X5J8B7W5VAQ, there are a total of five different mouse SERPINB3/B4
 25 homologs on three genomic contigs/scaffolds (see Table 3).

TABLE 3

Serpin	Human		% ID	Mouse	
	Accession #	Chromosome		Accession #	Chromosome
B2	P05120	18q21.3	75	NM_011111	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B3	P29508	18q21.3	58	Genomicb3 ^a	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
B4	P48594	18q21.3	60	AF063937 ^b	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
			60	Genomicb4 ^a	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
			59	AK003220 ^b	1 (GA_X5J8B7W2TTH)
			57	AK003650 ^b	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B5	P36952	18q21.3	89	NM_009257	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
B7	XP_036922	18q21.3	73	AK014524	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B8	P50452	18q21.3	78	NM_011459	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B10	P48595	18q21.3	72	Genomicb10 ^a	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B11	gspl Y15155	18q21.3	64	AK009003	1 (GA_X5J8B7W4D6C)
B12	THYPIN	18q21.3	72	AK009018	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)
B13	Q9UIV8	18q21.3	74	Genomicb13 ^a	1 (GA_X5J8B7W5VAQ)

Human chromosome 18 ov-serpins are presented with their highest percent identity mouse
 30 sequence match (BLAST: GCG, Madison WI) in Table 3. Human annotated protein sequences (Human-accession #) were compared to mouse translated nucleotide sequence (Mouse-accession #). Human references, except for Thypin and Y15155 (Derwent database), are available through NCBI

WO 02/072769

66

PCT/US02/07215

5 Protein Query, ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Protein. The mouse sequences are full-length cDNAs obtained from the NCBI, except where denoted as "Genomic" (*). These "Genomic" sequences are predicted full-length mouse homologies to human counterparts identified in the mouse genome (Celera Genomics, Rockville, MD). The genomic sequence exons were spliced empirically based on best estimates from a total alignment of the human and mouse sequences. The percent sequence identities shown are for annotated human proteins compared to translated cDNA sequences, or translated genomic sequences (%ID). Complete sequence matches for all the annotated cDNAs were localized on three independent mouse chromosome 1 genomic contigs/scaffolds (Mouse-Chromosome). (*) AF063937, AK003220, and AK003650 are all annotated in NCBI LocusLink as mouse SerpinB4 homologs (SCCA2, LocusID 20248).

15 The high sequence similarity shared between human ov-serpins is also conserved in the mouse members (see Table 4 below). The upper right diagonal (bold) shows percent sequence identity for the entire protein. The lower left diagonal presents the identity throughout the RSL (P17 through P4'). Most of the highly conserved residues identified in the serpin superfamily are also conserved in both human and mouse protein sequences.

20 **TABLE 4** Human and mouse ov-serpin amino acid sequence comparison

	HsB3	HsB4	AF063937	AK003220	AK003650	Genmcb3	Genmcb4
HsB3	100	91	59	59	55	57	59
HsB4	66	100	60	59	57	59	60
AF063937	52	57	100	86	82	85	79
AK003220	66	57	90	100	84	81	76
AK003650	29	33	62	62	100	78	74
Genmcb3	43	43	62	62	38	100	78
Genmcb4	48	52	48	48	33	43	100

EXAMPLE 8

25 Identification of Additional New Members of the Human Serpin Family

Using the same methods as were used to identify Thypin, we have identified five additional new members of the human serpin polypeptide family: IMX96506, IMX96866, IMX96983, IMX98220, and IMX 96909. Each of these new human serpins will be described in turn below.

30 IMX96506. The amino acid sequence of the IMX96506 polypeptide is presented in SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24 and SEQ ID NO:25 are subsequences of SEQ ID NO:23. SEQ ID NO:23 has an RSK sequence at amino acids 377 through 379 of SEQ ID NO:23; the cleavage site is predicted to be between Arg-377 and Ser-378. When analyzed using the GeneFold algorithm as described above, the IMX96506 polypeptide has maximal scores (scores of 999.9) in all categories to plasminogen activator inhibitor III and to alpha-antitrypsin.

35 IMX96866. The amino acid sequence of the IMX96866 polypeptide is presented in SEQ ID NO:26. The amino acid sequence for IMX96866 polypeptide appears incomplete, as it has an interhelical variable loop region, but does not extend to the RSL domain. However, when analyzed

WO 02/072769

67

PCT/US02/07215

5 using the GeneFold algorithm, the IMX96866 polypeptide also has maximal scores to plasminogen activator inhibitor III and to alpha-antitrypsin. Also, IMX96866 exhibits sequence similarity to rat and mouse kallikrein binding protein.

10 **IMX96983.** The amino acid sequence of the IMX96983 polypeptide is presented in SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28 is a subsequence of SEQ ID NO:27. The amino acid sequence of IMX96983 polypeptide has a substantial N-terminal extension (approximately 197 amino acids) relative to the ov-serpins; also it has a 'VLK' amino acid sequence (amino acids 544 through 546 of SEQ ID NO:27) and appears to lack the characteristic C-terminal residues of the ov-serpins. However, when analyzed using the GeneFold algorithm, the IMX96983 polypeptide also has maximal scores to plasminogen activator inhibitor III and to alpha-antitrypsin in all categories. IMX96983 polypeptide exhibits similarity to

15 nexin and neuroserpins.

IMX98220. The amino acid sequence of the IMX98220 polypeptide is presented in SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30 and SEQ ID NO:31 are subsequences of SEQ ID NO:29. IMX98220 polypeptide exhibits sequence similarity to cytoplasmic anti-proteinase 3 (CAP-3).

20 **IMX96909.** The amino acid sequence of the IMX96909 polypeptide is presented in SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33 is a human polypeptide sequence very similar to SEQ ID NO:32. SEQ ID NO:34 differs from SEQ ID NO:32 in that amino acids 252 through 262 of SEQ ID NO:32 are replaced by amino acids 252 through 257 in SEQ ID NO:34; this difference may represent a splice variation or a naturally occurring polymorphism. SEQ ID NO:35 is a subsequence of SEQ ID NO:34. When analyzed using the GeneFold algorithm, the IMX96909 polypeptide has maximal scores to

25 plasminogen activator inhibitor III and to alpha-antitrypsin in all categories.

EXAMPLE 9

Antisense Inhibition of Thylin Nucleic Acid Expression

In accordance with the present invention, a series of oligonucleotides are designed to target
30 different regions of the Thylin mRNA molecule, using the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 as the basis for the design of the oligonucleotides. The oligonucleotides are selected to be approximately 10, 12, 15, 18, or more preferably 20 nucleotide residues in length, and to have a predicted hybridization temperature that is at least 37°C. Preferably, the oligonucleotides are selected so that some will hybridize toward the 5' region of the mRNA molecule, others will hybridize to the coding region, and
35 still others will hybridize to the 3' region of the mRNA molecule.

The oligonucleotides may be oligodeoxynucleotides, with phosphorothioate backbones (internucleoside linkages) throughout, or may have a variety of different types of internucleoside linkages. Generally, methods for the preparation, purification, and use of a variety of chemically modified oligonucleotides are described in U.S. Patent No. 5,948,680. As specific examples, the
40 following types of nucleoside phosphoramidites may be used in oligonucleotide synthesis: deoxy and 2'-alkoxy amidites; 2'-fluoro amidites such as 2'-fluorodeoxyadenosine amidites, 2'-fluorodeoxyguanosine, 2'-fluorouridine, and 2'-fluorodeoxycytidine; 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified

WO 02/072769

68

PCT/US02/07215

- 5 amidites such as 2,2'-anhydro[1-(beta-D-arabino-furanosyl)-5-methyluridine], 2'-O-methoxyethyl-5-methyluridine, 2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyluridine, 3'-O-acetyl-2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyluridine, 3'-O-acetyl-2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methyl-4-triazoleuridine, 2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methylcytidine, N4-benzoyl-2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methylcytidine, and N4-benzoyl-2'-O-methoxyethyl-5'-O-dimethoxytrityl-5-methylcytidine-3'-amidite; 2'-O-(aminooxyethyl) nucleoside amidites and 2'-O-(dimethylaminoxyethyl) nucleoside amidites such as 2'-(dimethylaminoxyethoxy) nucleoside amidites, 5'-O-tert-butylidiphenylsilyl-O³-2'-anhydro-5-methyluridine, 5'-O-tert-butylidiphenylsilyl-2'-O-(2-hydroxyethyl)-5-methyluridine, 2'-O-[(2-phthalimidoxy)ethyl]-5'-tert-butylidiphenylsilyl-5-methyluridine, 5'-O-tert-butylidiphenylsilyl-2'-O-[(2-formadoximinooxy)ethyl]-5-methyluridine, 5'-O-tert-butylidiphenylsilyl-2'-O-[N,N-dimethylaminoxyethyl]-5-methyluridine, 2'-O-(dimethylaminoxyethyl)-5-methyluridine, 5'-O-DMT-2'-O-(dimethylaminoxyethyl)-5-methyluridine, and 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimethylaminoxyethyl)-5-methyluridine-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite]; and 2'-(aminooxyethoxy) nucleoside amidites such as N2-isobutyl-6-O-diphenylcarbamoyl-2'-O-(2-ethylacetyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)guanosine-3'-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite].

Modified oligonucleosides may also be used in oligonucleotide synthesis, for example methylenemethylimino-linked oligonucleosides, also called MMI-linked oligonucleosides; methylene-dimethylhydrazo-linked oligonucleosides, also called MDH-linked oligonucleosides; methylene-carbonylamino-linked oligonucleosides, also called amide-3-linked oligonucleosides; and methylene-aminocarbonyl-linked oligonucleosides, also called amide-4-linked oligonucleosides, as well as mixed backbone compounds having, for instance, alternating MMI and P=O or P=S linkages, which are prepared as described in U.S. Pat. Nos. 5,378,825, 5,386,023, 5,489,677, 5,602,240 and 5,610,289. Formacetal- and thioformacetal-linked oligonucleosides may also be used and are prepared as described in U.S. Pat. Nos. 5,264,562 and 5,264,564; and ethylene oxide linked oligonucleosides may also be used and are prepared as described in U.S. Pat. No. 5,223,618. Peptide nucleic acids (PNAs) may be used in the same manner as the oligonucleotides described above, and are prepared in accordance with any of the various procedures referred to in Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23; and U.S. Pat. Nos. 5,539,082, 5,700,922, and 5,719,262.

Chimeric oligonucleotides, oligonucleosides, or mixed oligonucleotides/oligonucleosides of the invention can be of several different types. These include a first type wherein the "gap" segment of linked nucleosides is positioned between 5' and 3' "wing" segments of linked nucleosides and a second "open end" type wherein the "gap" segment is located at either the 3' or the 5' terminus of the oligomeric compound. Oligonucleotides of the first type are also known in the art as "gapmers" or gapped oligonucleotides. Oligonucleotides of the second type are also known in the art as "hemimers" or "wingmers". Some examples of different types of chimeric oligonucleotides are: [2'-O-Me]--[2'-deoxy]--[2'-O-Me] chimeric phosphorothioate oligonucleotides, [2'-O-(2-methoxyethyl)]--[2'-deoxy]--

WO 02/072769

69

PCT/US02/07215

5 [2'-O-(methoxyethyl)] chimeric phosphorothioate oligonucleotides, and [2'-O-(2-methoxyethyl)phosphodiester]-[2'-deoxy phosphorothioate]-[2'-O-(2-methoxyethyl)phosphodiester] chimeric oligonucleotides, all of which may be prepared according to U.S. Patent No. 5,948,680. In one preferred embodiment, chimeric oligonucleotides ("gapmers") 18 nucleotides in length are utilized, composed of a central "gap" region consisting of ten 2'-deoxynucleotides, which is flanked on both sides (5' and 3' directions) by four-nucleotide "wings". The wings are composed of 2'-methoxyethyl (2'-MOE) nucleotides. The internucleoside (backbone) linkages are phosphorothioate (P=S) throughout the oligonucleotide. Cytidine residues in the 2'-MOE wings are 5-methylcytidines. Other chimeric oligonucleotides, chimeric oligonucleosides, and mixed chimeric oligonucleotides/oligonucleosides are synthesized according to U.S. Pat. No. 5,623,065.

15 Oligonucleotides are preferably synthesized via solid phase P(III) phosphoramidite chemistry on an automated synthesizer capable of assembling 96 sequences simultaneously in a standard 96 well format. The concentration of oligonucleotide in each well is assessed by dilution of samples and UV absorption spectroscopy. The full-length integrity of the individual products is evaluated by capillary electrophoresis, and base and backbone composition is confirmed by mass analysis of the compounds utilizing electrospray-mass spectroscopy.

20 The effect of antisense compounds on target nucleic acid expression can be tested in any of a variety of cell types provided that the target nucleic acid is present at measurable levels. This can be routinely determined using, for example, PCR or Northern blot analysis. Cells are routinely maintained for up to 10 passages as recommended by the supplier. When cells reached 80% to 90% confluency, they are treated with oligonucleotide. For cells grown in 96-well plates, wells are washed once with 200 microliters OPTI-MEM-1 reduced-serum medium (Gibco BRL) and then treated with 130 microliters of OPTI-MEM-1 containing 3.75 g/mL LIPOFECTIN (Gibco BRL) and the desired oligonucleotide at a final concentration of 150 nM. After 4 hours of treatment, the medium is replaced with fresh medium. Cells are harvested 16 hours after oligonucleotide treatment. Preferably, the effect of several different oligonucleotides should be tested simultaneously, where the oligonucleotides hybridize to different portions of the target nucleic acid molecules, in order to identify the oligonucleotides producing the greatest degree of inhibition of expression of the target nucleic acid.

25 Antisense modulation of Thypin nucleic acid expression can be assayed in a variety of ways known in the art. For example, Thypin mRNA levels can be quantitated by, e.g., Northern blot analysis, competitive polymerase chain reaction (PCR), or real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Real-time quantitative RT-PCR is presently preferred. RNA analysis can be performed on total cellular RNA or poly(A)+ mRNA. Methods of RNA isolation and Northern blot analysis are taught in, for example, Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1, pp. 4.1.1-4.2.9 and 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1996. Real-time quantitative (PCR) can be conveniently accomplished using the commercially available ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, available from PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif. and used according to manufacturer's instructions. This fluorescence detection system allows high-throughput quantitation of PCR products.

WO 02/072769

70

PCT/US02/07215

5 As opposed to standard PCR, in which amplification products are quantitated after the PCR is completed, products in real-time quantitative PCR are quantitated as they accumulate. This is accomplished by including in the PCR reaction an oligonucleotide probe that anneals specifically between the forward and reverse PCR primers, and contains two fluorescent dyes. A reporter dye (e.g., JOE or FAM, obtained from either Operon Technologies Inc., Alameda, Calif. or PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.) is attached to the 5' end of the probe and a quencher dye (e.g., TAMRA, obtained from either Operon Technologies Inc., Alameda, Calif. or PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.) is attached to the 3' end of the probe. When the probe and dyes are intact, reporter dye emission is quenched by the proximity of the 3' quencher dye. During amplification, annealing of the probe to the target sequence creates a substrate that can be cleaved by the 5'-exonuclease activity of Taq polymerase. During the extension phase of the PCR amplification cycle, cleavage of the probe by Taq polymerase releases the reporter dye from the remainder of the probe (and hence from the quencher moiety) and a sequence-specific fluorescent signal is generated. With each cycle, additional reporter dye molecules are cleaved from their respective probes, and the fluorescence intensity is monitored at regular (six-second) intervals by laser optics built into the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. In each assay, a series of parallel reactions containing serial dilutions of mRNA from untreated control samples generates a standard curve that is used to quantitate the percent inhibition after antisense oligonucleotide treatment of test samples. Other methods of quantitative PCR analysis are also known in the art. Thypin protein levels can be quantitated in a variety of ways well known in the art, such as immunoprecipitation, Western blot analysis (immunoblotting), ELISA, or fluorescence-activated cell sorting (FACS). Antibodies directed to Thypin polypeptides can be prepared via conventional antibody generation methods such as those described herein. Immunoprecipitation methods, Western blot (immunoblot) analysis, and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are standard in the art (see, for example, Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.16.1-10.16.11, 10.8.1-10.8.21, and 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991).

All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference. Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WO 02/072769

71

PCT/US02/07215

5

CLAIMS

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - (a) a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or an antigenic fragment thereof;
 - (b) a polypeptide that comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids 61-107 of SEQ ID NO:2, amino acids 108-373 of SEQ ID NO:2, and amino acids 374-395 of SEQ ID NO:2, and further wherein the polypeptide has an amino acid sequence which when analyzed using GeneFold yields at least five hits that are serpins, and for which the score is 999.999;
 - (c) an Thypin variant that shares amino acid identity with the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the percent amino acid identity is selected from the group consisting of: at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97.5%, at least 99%, and at least 99.5%; and
 - (d) a polypeptide according to any of (a) through (c), wherein said polypeptide binds specifically with an antibody that also binds specifically with a Thypin polypeptide having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2.
2. A polypeptide encoded by a nucleic acid molecule that is capable of hybridizing under highly stringent conditions with the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, wherein said highly stringent conditions comprise hybridizing at 42°C in 50% formamide and 6 x SSC and washing at 68°C in 0.2 x SSC, and further wherein said polypeptide has an amino acid sequence which when analyzed using GeneFold yields at least five hits that are serpins, and for which the score is 999.999
3. A polypeptide encoded by a nucleic acid molecule that is capable of hybridizing under highly stringent conditions with the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, wherein said highly stringent conditions comprise hybridizing at 42°C in 50% formamide and 6 x SSC and washing at 68°C in 0.2 x SSC, and further wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids from 61 to 107 of SEQ ID NO:2, amino acids from 108 to 373 of SEQ ID NO:2 and amino acids from 374 to 395 of SEQ ID NO:2.
4. A polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acids from 61 to 107 of SEQ ID NO:2, amino acids from 108 to 373 of SEQ ID NO:2 and amino acids from 374 to 395 of SEQ ID NO:2, wherein said polypeptide is capable of eliciting an antibody that reacts specifically with a Thypin polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.

WO 02/072769

72

PCT/US02/07215

- 5
5. An isolated nucleic acid molecule having at least 15 nucleotides, wherein said nucleic acid molecule is capable of hybridizing under highly stringent conditions with the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or its complement, and further wherein said highly stringent conditions comprise hybridizing at 42°C in 50% formamide and 6 x SSC and washing at 68°C in 0.2 x SSC.
- 10
6. An isolated nucleic acid molecule according to claim 5, wherein said nucleic acid molecule is capable of encoding a Thypin polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or a variant thereof.
- 15
7. A nucleic acid molecule according to claim 5 that comprises a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1
8. An isolated genomic nucleic acid corresponding to the nucleic acid of any of claims 5 through 7.
- 20
9. An expression vector comprising at least one nucleic acid according to any of claims 5 through 8.
- 25
10. A recombinant host cell comprising at least one nucleic acid according to any of claims 5 through 8.
11. The recombinant host cell of claim 10, wherein the nucleic acid is integrated into the host cell genome.
- 30
12. A process for producing a polypeptide encoded by the nucleic acid of any of claims 5 through 8, comprising culturing a recombinant host cell under conditions promoting expression of said polypeptide, wherein the recombinant host cell comprises at least one nucleic acid according to any of claims 5 through 8.
- 35
13. The process of claim 12 further comprising purifying said polypeptide.
14. The polypeptide produced by the process of claim 13.
- 40
15. An isolated antibody that binds specifically with a polypeptide according to any of claims 1 through 4 or claim 14.

WO 02/072769

73

PCT/US02/07215

- 5 16. The antibody of claim 15 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
17. The antibody of claim 15 wherein the antibody is a human antibody.
18. The antibody of claim 15 wherein the antibody is a humanized antibody.
- 10 19. The antibody of claim 15 wherein the antibody inhibits the activity of the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 14.
20. A method of designing an inhibitor of the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 15 14, the method comprising the steps of determining the three-dimensional structure of such polypeptide, analyzing the three-dimensional structure for the likely binding sites of substrates, synthesizing a molecule that incorporates a predicted reactive site, and determining the polypeptide-inhibiting activity of the molecule.
- 20 21. A method for identifying compounds that alter Thypin polypeptide activity comprising
- (a) mixing a test compound with the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 14; and
- (b) determining whether the test compound alters the Thypin polypeptide activity of said polypeptide.
- 25 22. A method for identifying compounds that inhibit the binding activity of Thypin polypeptides comprising:
- (a) mixing a test compound with the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 14 and a binding partner of said polypeptide; and
- 30 (b) determining whether the test compound inhibits the binding activity of said polypeptide.
23. A method for increasing protease inhibitory activity comprising providing at least one compound selected from the group consisting of the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 14 and agonists of said polypeptides.
- 35 14 and agonists of said polypeptides.
24. The method of claim 23 wherein the method comprises increasing protease inhibitory activity in a patient by administering to said patient at least one compound selected from the group consisting of the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 14 and agonists of said polypeptides.
- 40 25. A method for decreasing protease inhibitory activity comprising providing at least one antagonist of the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 14.

WO 02/072769

74

PCT/US02/07215

5

26. The method of claim 25 wherein the method comprises decreasing protease inhibitory activity in a patient by administering at least one antagonist of the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim 14 to said patient.

10 27. The method of claim 25 wherein the antagonist is an antibody that specifically binds with and inhibits the activity of said polypeptide.

28. A method for treating a Thypin-meidated disorder comprising administering at least one compound selected from the group consisting of the polypeptide of any of claims 1 through 4 or claim

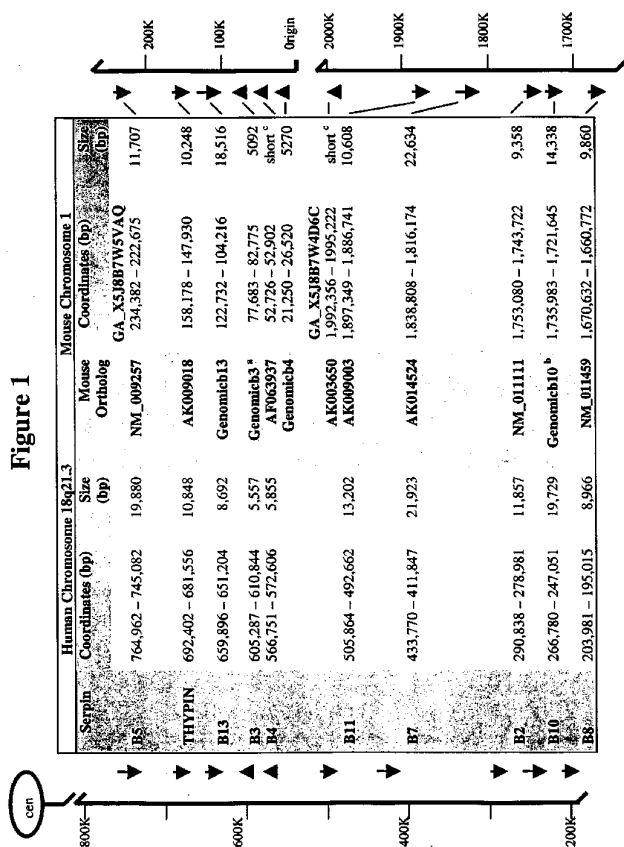
15 14, agonists and antagonists of said polypeptides.

WO 02/072769

1/1

PCT/US02/07215

Figure 1



WO 02/072769

1/44

PCT/US02/07215

SEQUENCE LISTING

<110> Immunex Corporation
 Clarke, Howard RG
 DuBose, Robert F
 Wiley, Steven R

<120> HUMAN SERPIN POLYPEPTIDES

<130> 3223-WO

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1278

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1278)

<223>

```

<400> 1
atg gac tct ctt gtt aca gca aac acc aaa ttt tgc ttt gat ctt ttt      48
Met Asp Ser Leu Val Thr Ala Asn Thr Lys Phe Cys Phe Asp Leu Phe
1          5          10          15

caa gag ata ggc aaa gat gat cgt cat aaa aac ata ttt ttc tct ccc      96
Gln Glu Ile Gly Lys Asp Asp Arg His Lys Asn Ile Phe Phe Ser Pro
          20          25          30

ctg agc ctc tca gct gcc ctt ggt atg gta cgc ttg ggt gct aga agt     144
Leu Ser Leu Ser Ala Ala Leu Gly Met Val Arg Leu Gly Ala Arg Ser
          35          40          45

gac agt gca cat cag att gat gag gta cta cac ttc aac gaa ttt tcc     192
Asp Ser Ala His Gln Ile Asp Glu Val Leu His Phe Asn Glu Phe Ser
          50          55          60

cag aat gaa agc aaa gaa cct gac cct tgt ctg aaa agc aac aaa caa     240
Gln Asn Glu Ser Lys Glu Pro Asp Pro Cys Leu Lys Ser Asn Lys Gln
          65          70          75          80

aaa gtg ctg gct gac agc tct ctg gag ggg cag aaa aaa acg aca gag     288
Lys Val Leu Ala Asp Ser Ser Leu Glu Gly Gln Lys Lys Thr Thr Glu
          85          90          95

cct ctg gat cag cag gct ggg tcc tta aac aat gag agc gga ctg gtc     336
Pro Leu Asp Gln Gln Ala Gly Ser Leu Asn Asn Glu Ser Gly Leu Val
          100          105          110

agc tgc tac ttt ggg cag ctt ctc tcc aaa tta gac agg atc aag act     384
Ser Cys Tyr Phe Gly Gln Leu Leu Ser Lys Leu Asp Arg Ile Lys Thr
          115          120          125

gat tac aca ctg agt att gcc aac agg ctt tat gga gag cag gaa ttc     432
Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Gln Glu Phe

```


WO 02/072769		2/44		PCT/US02/07215
130	135	140		
cca atc tgt cag gaa tac tta gat ggt gtg att caa ttt tac cac acg Pro Ile Cys Gln Glu Tyr Leu Asp Gly Val Ile Gln Phe Tyr His Thr 145	150	155	160	480
acg att gaa agt gtt gat ttc caa aaa aac cct gaa aaa tcc aga caa Thr Ile Glu Ser Val Asp Phe Gln Lys Asn Pro Glu Lys Ser Arg Gln 165	170	175		528
gag att aac ttc tgg gtt gaa tgt caa tcc caa ggt aaa atc aag gaa Glu Ile Asn Phe Trp Val Glu Cys Gln Ser Gln Gly Lys Ile Lys Glu 180	185	190		576
ctc ttc agc aag gac gct att aat gct gag act gtg ctg gta ctg gtg Leu Phe Ser Lys Asp Ala Ile Asn Ala Glu Thr Val Leu Val Leu Val 195	200	205		624
aat gct gtt tac ttc aag gcc aaa tgg gaa aca tac ttt gac cat gaa Asn Ala Val Tyr Phe Lys Ala Lys Trp Glu Thr Tyr Phe Asp His Glu 210	215	220		672
aac acg gtg gat gca cct ttc tgt cta aat gcg aat gaa aac aag agt Asn Thr Val Asp Ala Pro Phe Cys Leu Asn Ala Asn Glu Asn Lys Ser 225	230	235	240	720
gtg aag atg atg acg caa aaa ggc ctc tac aga att ggc ttc ata gag Val Lys Met Met Thr Gln Lys Gly Leu Tyr Arg Ile Gly Phe Ile Glu 245	250	255		768
gag gtg aag gca cag atc ctg gaa atg agg tac acc aag ggg aag ctc Glu Val Lys Ala Gln Ile Leu Glu Met Arg Tyr Thr Lys Gly Lys Leu 260	265	270		816
agc atg ttc gtg ctg ctg cca tct cac tct aaa gat aac ctg aag ggt Ser Met Phe Val Leu Leu Pro Ser His Ser Lys Asp Asn Leu Lys Gly 275	280	285		864
ctg gaa gag ctt gaa agg aaa atc acc tat gaa aaa atg gtg gcc tgg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Lys Ile Thr Tyr Glu Lys Met Val Ala Trp 290	295	300		912
agc agc tca gaa aac atg tca gaa gaa tgg gtg gtc ctg tcc ttc ccc Ser Ser Ser Glu Asn Met Ser Glu Glu Ser Val Val Leu Ser Phe Pro 305	310	315	320	960
cgg ttc acc ctg gaa gac agc tat gat ctc aat tcc att tta caa gac Arg Phe Thr Leu Glu Asp Ser Tyr Asp Asn Ser Ile Leu Gln Asp 325	330	335		1008
atg ggc att acg gat atc ttt gat gaa acg agg gct gat ctt act gga Met Gly Ile Thr Asp Ile Phe Asp Glu Thr Arg Ala Asp Leu Thr Gly 340	345	350		1056
atc tct cca agt ccc aat ttg tac ttg tca aaa att atc cac aaa acc Ile Ser Pro Ser Pro Asn Leu Tyr Leu Ser Lys Ile Ile His Lys Thr 355	360	365		1104
ttt gtg gag gtg gat gaa aac ggt acc cag gca gct gca gcc act ggg Phe Val Glu Val Asp Glu Asn Gly Thr Gln Ala Ala Ala Thr Gly 370	375	380		1152

WO 02/072769

3/44

PCT/US02/07215

gct gtt gtc tcg gaa agg tca cta cga tct tgg gtg gag ttt aat gcc 1200
 Ala Val Val Ser Glu Arg Ser Leu Arg Ser Trp Val Glu Phe Asn Ala
 385 390 395 400

aac cac cct ttt ctc ttt ttc att aga cac aac aaa acc caa acc att 1248
 Asn His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Lys Thr Gln Thr Ile
 405 410 415

ctc ttt tat ggc agg gtc tgc tct cct taa 1278
 Leu Phe Tyr Gly Arg Val Cys Ser Pro
 420 425

<210> 2
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Ser Leu Val Thr Ala Asn Thr Lys Phe Cys Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15

Gln Glu Ile Gly Lys Asp Asp Arg His Lys Asn Ile Phe Phe Ser Pro
 20 25 30

Leu Ser Leu Ser Ala Ala Leu Gly Met Val Arg Leu Gly Ala Arg Ser
 35 40 45

Asp Ser Ala His Gln Ile Asp Glu Val Leu His Phe Asn Glu Phe Ser
 50 55 60

Gln Asn Glu Ser Lys Glu Pro Asp Pro Cys Leu Lys Ser Asn Lys Gln
 65 70 75 80

Lys Val Leu Ala Asp Ser Ser Leu Glu Gly Gln Lys Lys Thr Thr Glu
 85 90 95

Pro Leu Asp Gln Gln Ala Gly Ser Leu Asn Asn Glu Ser Gly Leu Val
 100 105 110

Ser Cys Tyr Phe Gly Gln Leu Leu Ser Lys Leu Asp Arg Ile Lys Thr
 115 120 125

Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Gln Glu Phe
 130 135 140

Pro Ile Cys Gln Glu Tyr Leu Asp Gly Val Ile Gln Phe Tyr His Thr
 145 150 155 160

WO 02/072769

4/44

PCT/US02/07215

Thr Ile Glu Ser Val Asp Phe Gln Lys Asn Pro Glu Lys Ser Arg Gln
 165 170 175
 Glu Ile Asn Phe Trp Val Glu Cys Gln Ser Gln Gly Lys Ile Lys Glu
 180 185 190
 Leu Phe Ser Lys Asp Ala Ile Asn Ala Glu Thr Val Leu Val Leu Val
 195 200 205
 Asn Ala Val Tyr Phe Lys Ala Lys Trp Glu Thr Tyr Phe Asp His Glu
 210 215 220
 Asn Thr Val Asp Ala Pro Phe Cys Leu Asn Ala Asn Glu Asn Lys Ser
 225 230 235 240
 Val Lys Met Met Thr Gln Lys Gly Leu Tyr Arg Ile Gly Phe Ile Glu
 245 250 255
 Glu Val Lys Ala Gln Ile Leu Glu Met Arg Tyr Thr Lys Gly Lys Leu
 260 265 270
 Ser Met Phe Val Leu Leu Pro Ser His Ser Lys Asp Asn Leu Lys Gly
 275 280 285
 Leu Glu Glu Leu Glu Arg Lys Ile Thr Tyr Glu Lys Met Val Ala Trp
 290 295 300
 Ser Ser Ser Glu Asn Met Ser Glu Glu Ser Val Val Leu Ser Phe Pro
 305 310 315 320
 Arg Phe Thr Leu Glu Asp Ser Tyr Asp Leu Asn Ser Ile Leu Gln Asp
 325 330 335
 Met Gly Ile Thr Asp Ile Phe Asp Glu Thr Arg Ala Asp Leu Thr Gly
 340 345 350
 Ile Ser Pro Ser Pro Asn Leu Tyr Leu Ser Lys Ile Ile His Lys Thr
 355 360 365
 Phe Val Glu Val Asp Glu Asn Gly Thr Gln Ala Ala Ala Thr Gly
 370 375 380
 Ala Val Val Ser Glu Arg Ser Leu Arg Ser Trp Val Glu Phe Asn Ala
 385 390 395 400
 Asn His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Lys Thr Gln Thr Ile

WO 02/072769	5/44	PCT/US02/07215
405	410	415
Leu Phe Tyr Gly Arg Val Cys Ser Pro		
420	425	
<210> 3		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> oligonucleotide		
<400> 3		
tggttttaga tcgttataag ttttac		26
<210> 4		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> oligonucleotide		
<400> 4		
ctccagctcc aaagtactag acactgctcc		30
<210> 5		
<211> 38		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> oligonucleotide		
<400> 5		
atactagtag tatggactct cttgttacag caaacacc		38
<210> 6		
<211> 40		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> oligonucleotide		
<400> 6		
tagcggccgc ttaaggagag cagaccctgc cataaaagag		40
<210> 7		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		

WO 02/072769

6/44

PCT/US02/07215

<223> oligonucleotide

<400> 7

atggactctc ttgttacagc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 8

ctctccataa agcctgttgg

20

<210> 9

<211> 379

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Glu Gln Leu Ser Ser Ala Asn Thr Arg Phe Ala Leu Asp Leu Phe
1 5 10 15Leu Ala Leu Ser Glu Asn Asn Pro Ala Gly Asn Ile Phe Ile Ser Pro
20 25 30Phe Ser Ile Ser Ser Ala Met Ala Met Val Phe Leu Gly Thr Arg Gly
35 40 45Asn Thr Ala Ala Gln Leu Ser Lys Thr Phe His Phe Asn Thr Val Glu
50 55 60Glu Val His Ser Arg Phe Gln Ser Leu Asn Ala Asp Ile Asn Lys Arg
65 70 75 80Gly Ala Ser Tyr Ile Leu Lys Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Lys
85 90 95Thr Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Phe Leu Val Ser Thr Gln Lys Thr Tyr
100 105 110Gly Ala Asp Leu Ala Ser Val Asp Phe Gln His Ala Ser Glu Asp Ala
115 120 125Arg Lys Thr Ile Asn Gln Trp Val Lys Gly Gln Thr Glu Gly Lys Ile
130 135 140

WO 02/072769

7/44

PCT/US02/07215

Pro Glu Leu Leu Ala Ser Gly Met Val Asp Asn Met Thr Lys Leu Val
 145 150 155 160
 Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asn Trp Lys Asp Lys Phe Met
 165 170 175
 Lys Glu Ala Thr Thr Asn Ala Pro Phe Arg Leu Asn Lys Lys Asp Arg
 180 185 190
 Lys Thr Val Lys Met Met Tyr Gln Lys Lys Lys Phe Ala Tyr Gly Tyr
 195 200 205
 Ile Glu Asp Leu Lys Cys Arg Val Leu Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Glu
 210 215 220
 Glu Leu Ser Met Val Ile Leu Leu Pro Asp Asp Ile Glu Asp Glu Ser
 225 230 235 240
 Thr Gly Leu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Leu His
 245 250 255
 Glu Trp Thr Lys Pro Glu Asn Leu Asp Phe Ile Glu Val Asn Val Ser
 260 265 270
 Leu Pro Arg Phe Lys Leu Glu Glu Ser Tyr Thr Leu Asn Ser Asp Leu
 275 280 285
 Ala Arg Leu Gly Val Gln Asp Leu Phe Asn Ser Ser Lys Ala Asp Leu
 290 295 300
 Ser Gly Met Ser Gly Ala Arg Asp Ile Phe Ile Ser Lys Ile Val His
 305 310 315 320
 Lys Ser Phe Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
 325 330 335
 Thr Ala Gly Ile Ala Thr Phe Cys Met Leu Met Pro Glu Glu Asn Phe
 340 345 350
 Thr Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Ser Ser Gly
 355 360 365
 Ser Ile Leu Phe Leu Gly Arg Phe Ser Ser Pro
 370 375

<210> 10

WO 02/072769

8/44

PCT/US02/07215

<211> 415
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

```

Met Glu Asp Leu Cys Val Ala Asn Thr Leu Phe Ala Leu Asn Leu Phe
1      5      10      15

Lys His Leu Ala Lys Ala Ser Pro Thr Gln Asn Leu Phe Leu Ser Pro
20     25     30

Trp Ser Ile Ser Ser Thr Met Ala Met Val Tyr Met Gly Ser Arg Gly
35     40     45

Ser Thr Glu Asp Gln Met Ala Lys Val Leu Phe Asn Glu Val Gly
50     55     60

Ala Asn Ala Val Thr Pro Met Thr Pro Glu Asn Phe Thr Ser Cys Gly
65     70     75     80

Phe Met Gln Gln Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Pro Asp Ala Ile Leu Gln
85     90     95

Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile His Ser Ser Phe Arg Ser Leu Ser Ser
100    105    110

Ala Ile Asn Ala Ser Thr Gly Asn Tyr Leu Leu Glu Ser Val Asn Lys
115    120    125

Leu Phe Gly Glu Lys Ser Ala Ser Phe Arg Glu Glu Tyr Ile Arg Leu
130    135    140

Cys Gln Lys Tyr Tyr Ser Ser Glu Pro Gln Ala Val Asp Phe Leu Glu
145    150    155    160

Cys Ala Glu Glu Ala Arg Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Lys Thr Gln
165    170    175

Thr Lys Gly Lys Ile Pro Asn Leu Leu Pro Glu Gly Ser Val Asp Gly
180    185    190

Asp Thr Arg Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp
195    200    205

Lys Thr Pro Phe Glu Lys Lys Leu Asn Gly Leu Tyr Pro Phe Arg Val
210    215    220

```

WO 02/072769

9/44

PCT/US02/07215

Asn Ser Ala Gln Arg Thr Pro Val Gln Met Met Tyr Leu Arg Glu Lys
 225 230 235 240

Leu Asn Ile Gly Tyr Ile Glu Asp Leu Lys Ala Gln Ile Leu Glu Leu
 245 250 255

Pro Tyr Ala Gly Asp Val Ser Met Phe Leu Leu Leu Pro Asp Glu Ile
 260 265 270

Ala Asp Val Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Glu Ser Glu Ile Thr Tyr
 275 280 285

Asp Lys Leu Asn Lys Trp Thr Ser Lys Asp Lys Met Ala Glu Asp Glu
 290 295 300

Val Glu Val Tyr Ile Pro Gln Phe Lys Leu Glu Glu His Tyr Glu Leu
 305 310 315 320

Arg Ser Ile Leu Arg Ser Met Gly Met Glu Asp Ala Phe Asn Lys Gly
 325 330 335

Arg Ala Asn Phe Ser Gly Met Ser Glu Arg Asn Asp Leu Phe Leu Ser
 340 345 350

Glu Val Phe His Gln Ala Met Val Asp Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu
 355 360 365

Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Val Met Thr Gly Arg Thr Gly His Gly
 370 375 380

Gly Pro Gln Phe Val Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Leu Ile Met His
 385 390 395 400

Lys Ile Thr Asn Cys Ile Leu Phe Phe Gly Arg Phe Ser Ser Pro
 405 410 415

<210> 11
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met Asp Ser Leu Ala Thr Ser Ile Asn Gln Phe Ala Leu Glu Leu Ser
 1 5 10 15

Lys Lys Leu Ala Glu Ser Ala Gln Gly Lys Asn Ile Phe Phe Ser Ser

WO 02/072769 10/44 PCT/US02/07215

20 25 30

Trp Ser Ile Ser Thr Ser Leu Thr Ile Val Tyr Leu Gly Ala Lys Gly
35 40 45

Thr Thr Ala Ala Gln Met Ala Gln Val Leu Gln Phe Asn Arg Asp Gln
50 55 60

Gly Val Lys Cys Asp Pro Glu Ser Glu Lys Lys Arg Lys Met Glu Phe
65 70 75 80

Asn Leu Ser Asn Ser Glu Glu Ile His Ser Asp Phe Gln Thr Leu Ile
85 90 95

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

Ala Ile Tyr Gly Glu Lys Thr Tyr Ala Phe His Asn Lys Tyr Leu Glu
115 120 125

Asp Met Lys Thr Tyr Phe Gly Ala Glu Pro Gln Pro Val Asn Phe Val
130 135 140

Glu Ala Ser Asp Gln Ile Arg Lys Asp Ile Asn Ser Trp Val Glu Arg
145 150 155 160

Gln Thr Glu Gly Lys Ile Gln Asn Leu Leu Pro Asp Asp Ser Val Asp
165 170 175

Ser Thr Thr Arg Met Ile Leu Val Asn Ala Leu Tyr Phe Lys Gly Ile
180 185 190

Trp Glu His Gln Phe Leu Val Gln Asn Thr Thr Glu Lys Pro Phe Arg
195 200 205

Ile Asn Glu Thr Thr Ser Lys Pro Val Gln Met Met Phe Met Lys Lys
210 215 220

Lys Leu His Ile Phe His Ile Glu Lys Pro Lys Ala Val Gly Leu Gln
225 230 235 240

Leu Tyr Tyr Lys Ser Arg Asp Leu Ser Leu Leu Ile Leu Leu Pro Glu
245 250 255

Asp Ile Asn Gly Leu Glu Gln Leu Glu Lys Ala Ile Thr Tyr Glu Lys
260 265 270

WO 02/072769

11/44

PCT/US02/07215

Leu Asn Glu Trp Thr Ser Ala Asp Met Met Glu Leu Tyr Glu Val Gln
 275 280 285
 Leu His Leu Pro Lys Phe Lys Leu Glu Asp Ser Tyr Asp Leu Lys Ser
 290 295 300
 Thr Leu Ser Ser Met Gly Met Ser Asp Ala Phe Ser Gln Ser Lys Ala
 305 310 315 320
 Asp Phe Ser Gly Met Ser Ser Ala Arg Asn Leu Phe Leu Ser Asn Val
 325 330 335
 Phe His Lys Ala Phe Val Glu Ile Asn Glu Gln Gly Thr Glu Ala Ala
 340 345 350
 Ala Gly Ser Gly Ser Glu Ile Asp Ile Arg Ile Arg Val Pro Ser Ile
 355 360 365
 Glu Phe Asn Ala Asn His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Lys
 370 375 380
 Thr Asn Thr Ile Leu Phe Tyr Gly Arg Leu Cys Ser Pro
 385 390 395
 <210> 12
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Met Asn Ser Leu Ser Glu Ala Asn Thr Lys Phe Met Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15
 Gln Gln Phe Arg Lys Ser Lys Glu Asn Asn Ile Phe Tyr Ser Pro Ile
 20 25 30
 Ser Ile Thr Ser Ala Leu Gly Met Val Leu Leu Gly Ala Lys Asp Asn
 35 40 45
 Thr Ala Gln Gln Ile Lys Lys Val Leu His Phe Asp Gln Val Thr Glu
 50 55 60
 Asn Thr Thr Gly Lys Ala Ala Thr Tyr His Val Asp Arg Ser Gly Asn
 65 70 75 80

WO 02/072769

12/44

PCT/US02/07215

Val His His Gln Phe Gln Lys Leu Leu Thr Glu Phe Asn Lys Ser Thr
 85 90 95
 Asp Ala Tyr Glu Leu Lys Ile Ala Asn Lys Leu Phe Gly Glu Lys Thr
 100 105 110
 Tyr Leu Phe Leu Gln Glu Tyr Leu Asp Ala Ile Lys Lys Phe Tyr Gln
 115 120 125
 Thr Ser Val Glu Ser Val Asp Phe Ala Asn Ala Pro Glu Glu Ser Arg
 130 135 140
 Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Glu Lys Ile Lys
 145 150 155 160
 Asn Leu Ile Pro Glu Gly Asn Ile Gly Ser Asn Thr Thr Leu Val Leu
 165 170 175
 Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Glu Lys Lys Phe Asn Lys
 180 185 190
 Glu Asp Thr Lys Glu Glu Lys Phe Trp Pro Asn Lys Asn Thr Tyr Lys
 195 200 205
 Ser Ile Gln Met Met Arg Gln Tyr Thr Ser Phe His Phe Ala Ser Leu
 210 215 220
 Glu Asp Val Gln Ala Lys Val Leu Glu Ile Pro Tyr Lys Gly Lys Asp
 225 230 235 240
 Leu Ser Met Ile Val Leu Leu Pro Asn Glu Ile Asp Gly Leu Gln Lys
 245 250 255
 Leu Glu Glu Lys Leu Thr Ala Glu Lys Leu Met Glu Trp Thr Ser Leu
 260 265 270
 Gln Asn Met Arg Glu Thr Arg Val Asp Leu His Leu Pro Arg Phe Lys
 275 280 285
 Val Glu Glu Ser Tyr Asp Leu Lys Asp Thr Leu Arg Thr Met Gly Met
 290 295 300
 Val Asp Ile Phe Asn Gly Asp Ala Asp Leu Ser Gly Met Thr Gly Ser
 305 310 315 320
 Arg Gly Leu Val Leu Ser Gly Val Leu His Lys Ala Phe Val Glu Val

WO 02/072769 13/44 PCT/US02/07215

325 330 335

Thr Glu Glu Gly Ala Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Val Gly Phe
340 345 350

Gly Ser Ser Ser Pro Ala Ser Thr Asn Glu Glu Phe His Cys Asn His Pro
355 360 365

Phe Leu Phe Phe Ile Arg Gln Asn Lys Thr Asn Ser Ile Leu Phe Tyr
370 375 380

Gly Arg Phe Ser Ser Pro
385 390

<210> 13
<211> 390
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Asn Ser Leu Ser Glu Ala Asn Thr Lys Phe Met Phe Asp Leu Phe
1 5 10 15

Gln Gln Phe Arg Lys Ser Lys Glu Asn Asn Ile Phe Tyr Ser Pro Ile
20 25 30

Ser Ile Thr Ser Ala Leu Gly Met Val Leu Leu Gly Ala Lys Asp Asn
35 40 45

Thr Ala Gln Gln Ile Ser Lys Val Leu His Phe Asp Gln Val Thr Glu
50 55 60

Asn Thr Thr Glu Lys Ala Ala Thr Tyr His Val Asp Arg Ser Gly Asn
65 70 75 80

Val His His Gln Phe Gln Lys Leu Leu Thr Glu Phe Asn Lys Ser Thr
85 90 95

Asp Ala Tyr Glu Leu Lys Ile Ala Asn Lys Leu Phe Gly Glu Lys Thr
100 105 110

Tyr Gln Phe Leu Gln Glu Tyr Leu Asp Ala Ile Lys Lys Phe Tyr Gln
115 120 125

Thr Ser Val Glu Ser Thr Asp Phe Ala Asn Ala Pro Glu Glu Ser Arg
130 135 140

WO 02/072769

14/44

PCT/US02/07215

Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Glu Lys Ile Lys
 145 150 155 160
 Asn Leu Phe Pro Asp Gly Thr Ile Gly Asn Asp Thr Thr Leu Val Leu
 165 170 175
 Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Glu Asn Lys Phe Lys Lys
 180 185 190
 Glu Asn Thr Lys Glu Glu Lys Phe Trp Pro Asn Lys Asn Thr Tyr Lys
 195 200 205
 Ser Val Gln Met Met Arg Gln Tyr Asn Ser Phe Asn Phe Ala Leu Leu
 210 215 220
 Glu Asp Val Gln Ala Lys Val Leu Glu Ile Pro Tyr Lys Gly Lys Asp
 225 230 235 240
 Leu Ser Met Ile Val Leu Leu Pro Asn Glu Ile Asp Gly Leu Gln Lys
 245 250 255
 Leu Glu Glu Lys Leu Thr Ala Glu Lys Leu Met Glu Trp Thr Ser Leu
 260 265 270
 Gln Asn Met Arg Glu Thr Cys Val Asp Leu His Leu Pro Arg Phe Lys
 275 280 285
 Met Glu Glu Ser Tyr Asp Leu Lys Asp Thr Leu Arg Thr Met Gly Met
 290 295 300
 Val Asn Ile Phe Asn Gly Asp Ala Asp Leu Ser Gly Met Thr Trp Ser
 305 310 315 320
 His Gly Leu Ser Val Ser Lys Val Leu His Lys Ala Phe Val Glu Val
 325 330 335
 Thr Glu Glu Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ala Val Val Val
 340 345 350
 Glu Leu Ser Ser Pro Ser Thr Asn Glu Glu Phe Cys Cys Asn His Pro
 355 360 365
 Phe Leu Phe Phe Ile Arg Gln Asn Lys Thr Asn Ser Ile Leu Phe Tyr
 370 375 380

WO 02/072769

15/44

PCT/US02/07215

Gly Arg Phe Ser Ser Pro
385 390

<210> 14
<211> 617
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(90)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (215)..(215)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (225)..(225)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (232)..(233)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (289)..(289)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (309)..(309)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (318)..(318)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (322)..(322)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (331)..(332)
<223> unsure

WO 02/072769

16/44

PCT/US02/07215

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (367)..(367)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (369)..(369)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (374)..(374)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (378)..(378)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (425)..(425)
<223> unsure

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (430)..(430)
<223> unsure

<400> 14

Met Gly Ser Leu Ser Thr Ala Asn Val Glu Phe Cys Leu Asp Val Phe
1 5 10 15

Lys Glu Leu Asn Ser Asn Asn Ile Gly Asp Asn Ile Phe Phe Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Leu Tyr Ala Leu Ser Met Val Leu Leu Gly Ala Arg Gly
35 40 45

Glu Thr Ala Glu Gln Leu Glu Lys Val Leu His Phe Ser His Thr Val
50 55 60

Asp Ser Leu Lys Pro Gly Phe Lys Asp Ser Pro Lys Cys Ser Gln Ala
65 70 75 80

Gly Arg Ile His Ser Glu Phe Gly Val Xaa Phe Ser Gln Ile Asn Gln

WO 02/072769 17/44 PCT/US02/07215

85 90 95

Pro Asp Ser Asn Cys Thr Leu Ser Ile Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Thr
100 105 110

Lys Thr Met Ala Phe His Gln Gln Tyr Leu Ser Cys Ser Glu Lys Trp
115 120 125

Tyr Gln Ala Arg Leu Gln Thr Val Asp Phe Glu Gln Ser Thr Glu Glu
130 135 140

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

Val Ala Asn Leu Phe Gly Lys Ser Thr Ile Asp Pro Ser Ser Val Met
165 170 175

Val Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Gln Asn Lys Phe
180 185 190

Gln Val Arg Glu Thr Val Lys Ser Pro Phe Gln Leu Ser Glu Val Ser
195 200 205

Ile Leu Phe Ser Asp Ser Xaa Gln Met Leu Glu Asp Thr Ile Ile Ile
210 215 220

Xaa Gly Gln Phe Arg Lys Met Xaa Xaa Phe Ser Glu Asn Ile Gly Leu
225 230 235 240

Gly Phe Cys Trp Phe Phe Leu Leu Tyr Phe Leu Gln Ile Phe Ile Phe
245 250 255

Pro Leu Leu Ser Asp Asn Asn Phe Tyr His Arg Ala Pro Asn Trp Arg
260 265 270

Leu Gly Ile Leu Arg Phe Ser Gly Arg Gly Glu Asn Pro Phe Phe Ser
275 280 285

Xaa Arg Ser Leu Gly Leu Phe Phe Pro Tyr Ile Leu Trp Leu Cys Ser
290 295 300

Pro Ala Ala His Xaa Gly Tyr Leu Cys Tyr Phe Phe Phe Xaa Arg Val
305 310 315 320

Ser Xaa Gly Lys Ile Lys Lys Lys Met Ile Xaa Xaa Tyr Ile Leu Phe
325 330 335

WO 02/072769

18/44

PCT/US02/07215

Leu Pro Thr Lys Ile Met Leu Ala Lys Asn Pro Asp Phe Val Phe Gly
340 345 350

Arg Pro Ser Tyr Leu Tyr Ile Leu Leu Glu Gln Phe Ser Leu Xaa Pro
355 360 365

Xaa Leu Ile Leu Asn Xaa Lys Asn Gly Xaa Pro Leu Gln Arg Glu Val
370 375 380

Ile Arg Asn Leu Leu Cys Ser Phe Tyr Phe Thr His Ala Phe Arg Val
385 390 395 400

Phe Met Gln Ile Ser Val Leu Arg Lys Val Ile Ser Thr His Thr Cys
405 410 415

Ala Leu Thr Tyr Val Ser Ile Leu Xaa Ser Phe Ser Ser Xaa Gln Gly
420 425 430

Lys Asn Val Thr Val Glu Met Met Tyr Gln Ile Gly Thr Phe Lys Leu
435 440 445

Ala Phe Val Lys Glu Pro Gln Met Gln Val Leu Glu Leu Pro Tyr Val
450 455 460

Asn Asn Lys Leu Ser Met Ile Ile Leu Leu Pro Val Gly Ile Ala Asn
465 470 475 480

Leu Lys Gln Ile Glu Lys Gln Leu Asn Ser Gly Thr Phe His Glu Trp
485 490 495

Thr Ser Ser Ser Asn Met Met Glu Arg Glu Val Glu Val His Leu Pro
500 505 510

Arg Phe Lys Leu Glu Thr Lys Tyr Glu Leu Asn Ser Leu Leu Lys Ser
515 520 525

Leu Gly Val Thr Asp Leu Phe Asn Gln Val Lys Ala Asp Leu Ser Gly
530 535 540

Met Ser Pro Thr Lys Gly Leu Tyr Leu Ser Lys Ala Ile His Lys Ser
545 550 555 560

Tyr Leu Asp Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Gly
565 570 575

WO 02/072769

19/44

PCT/US02/07215

Asp Ser Ile Ala Val Lys Ser Leu Pro Met Arg Ala Gln Phe Lys Ala
580 585 590

Asn His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Thr His Thr Asn Thr Ile
595 600 605

Leu Phe Cys Gly Lys Leu Ala Ser Pro
610 615

<210> 15
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic fusion protein

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Tyr Lys Asp Glu Gly Ser His His His His His
20 25 30

His Gly Thr Ser Ser
35

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 16
aacgacagag cctctggatc ag 22

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 17
gagaagctgc ccaaagtagc a 21

<210> 18
<211> 29

WO 02/072769

20/44

PCT/US02/07215

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 18
cagtcggtc tcattgttta aggacccag

29

<210> 19
<211> 384
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (124)..(124)
<223> unsure

<400> 19

Met His Leu Phe Ala Glu Thr Ile Asn Lys Phe Thr Leu Glu Leu Tyr
1 5 10 15

Arg Gln Leu Arg Glu Ser Asp Asn Asn Ile Phe Tyr Ser Pro Ile Ser
20 25 30

Met Met Thr Ala Leu Ala Met Leu Gln Leu Gly Ala Lys Gly Asn Thr
35 40 45

Glu Lys Gln Ile Glu Lys Val Leu Gln Phe Asn Glu Thr Thr Lys Lys
50 55 60

Thr Thr Glu Lys Ser Ala His Cys His Asp Glu Lys Asn Val His Glu
65 70 75 80

Gln Phe Gln Lys Phe Met Thr Gln Leu Asn Lys Ser Asn Asp Ala Tyr
85 90 95

Asp Leu Lys Thr Ala Asn Ser Ile Tyr Gly Ala Lys Ala Phe Pro Phe
100 105 110

Leu Gln Thr Phe Leu Glu Asp Ile Lys Lys Tyr Xaa Glu Val Asn Val
115 120 125

Glu Ser Leu Asp Phe Ala His Ala Ala Glu Glu Arg Gln Lys Lys Ile
130 135 140

Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Lys Ile Lys Asp Leu Phe
145 150 155 160

WO 02/072769

21/44

PCT/US02/07215

Pro Ser Gly Ser Leu Asn Ser Ser Thr Ile Leu Val Leu Val Asn Ala
 165 170 175
 Val Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Asn His Thr Phe Asp Glu Lys His Thr
 180 185 190
 Lys Glu Glu Lys Phe Trp Leu Asn Lys Asn Thr Ser Lys Pro Val Gln
 195 200 205
 Met Met Lys Gln Arg Asn Lys Phe Asn Phe Met Phe Leu Glu Asp Val
 210 215 220
 Gln Thr Lys Ile Val Glu Ile Pro Tyr Lys Gly Lys Glu Leu Ser Met
 225 230 235 240
 Phe Val Leu Leu Pro Val Glu Ile Asp Gly Leu Lys Lys Leu Glu Glu
 245 250 255
 Gln Leu Ser Thr Glu Lys Leu Leu Glu Trp Thr Arg Ala Glu Asn Met
 260 265 270
 His Met Thr Glu Leu Tyr Leu Ser Leu Pro Arg Phe Lys Val Glu Glu
 275 280 285
 Lys Tyr Asp Leu Ser Val Pro Leu Lys His Met Gly Met Val Gly Ala
 290 295 300
 Phe Asp Pro Gln Lys Ala Asp Phe Ser Gly Met Asn Ser Thr Gln Gly
 305 310 315 320
 Leu Val Val Ser Lys Val Leu His Lys Ser Phe Val Glu Val Asn Glu
 325 330 335
 Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Thr Thr Gly Ile Lys Ser His Asn Leu
 340 345 350
 Ser Leu Gln Ile Thr Glu Asp Phe Tyr Cys Asp His Pro Leu Val Lys
 355 360 365
 His Ser Lys Thr Asn Ser Ile Leu Phe Phe Gly Thr Ile Ser Ser Pro
 370 375 380
 <210> 20
 <211> 387
 <212> PRT

WO 02/072769

22/44

PCT/US02/07215

<213> Mus musculus

<400> 20

Met Asp Leu Phe Ala Val Ala Thr Thr Lys Phe Thr Leu Glu Leu Tyr
1 5 10 15

Arg Gln Leu Arg Glu Ser Asp Asn Asn Ile Phe Tyr Ser Pro Ile Ser
20 25 30

Met Met Arg Thr Leu Ala Met Leu Leu Gly Ala Lys Ala Asn Thr
35 40 45

Glu Gln Gln Ile Lys Lys Val Leu His Phe Asn Glu Thr Thr Lys Lys
50 55 60

Thr Thr Glu Lys Ser Ala Glu Ser His Asp Glu Glu Asn Val His Gln
65 70 75 80

Gln Phe Gln Met Leu Met Thr Gln Leu Asn Lys Phe Asn Asn Ala Tyr
85 90 95

Asp Leu Lys Val Pro Asn Ser Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Phe Pro Phe
100 105 110

Leu Gln Thr Phe Leu Lys Asp Ile Arg Lys Tyr Tyr Gln Ala Asn Val
115 120 125

Glu Ser Leu Asp Phe Ala His Ala Ala Glu Glu Ser Gln Lys Lys Ile
130 135 140

Asn Ser Trp Met Ala Arg Gln Thr Asn Gly Lys Ile Lys Asp Leu Phe
145 150 155 160

Pro Ser Gly Ser Leu Asn Ser Ser Thr Ile Leu Val Leu Val Asn Ala
165 170 175

Val Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Asn His Lys Phe Asp Glu Lys His Thr
180 185 190

Arg Glu Glu Lys Phe Trp Leu Asn Lys Asn Thr Ser Lys Pro Val Gln
195 200 205

Met Met Lys Gln Arg Asn Lys Phe Asn Phe Ile Phe Leu Glu Asn Val
210 215 220

Gln Ala Lys Ile Val Glu Ile Pro Tyr Lys Gly Lys Glu Leu Ser Met

WO 02/072769 23/44 PCT/US02/07215

225 230 235 240

Phe Val Leu Leu Pro Val Glu Ile Asp Gly Leu Lys Lys Phe Glu Glu
245 250 255

Gln Leu Thr Ala Asp Lys Leu Leu Gln Trp Thr Arg Ala Glu Asn Met
260 265 270

His Leu Thr Glu Leu Tyr Leu Ser Leu Pro Gln Phe Lys Val Glu Glu
275 280 285

Lys Tyr Asp Leu Arg Val Pro Leu Glu His Met Gly Met Val Asp Ala
290 295 300

Phe Asp Pro Gln Lys Ala Asp Phe Ser Gly Met Ser Asn Ser Gln Gly
305 310 315 320

Leu Val Val Ser Lys Val Leu His Lys Ser Phe Val Glu Val Asn Glu
325 330 335

Glu Gly Ala Glu Ala Ala Thr Ala Met Ser Val Glu Ser Arg Ser Leu
340 345 350

Ser Val Pro Lys Pro Asn Asp Phe Ser Cys Asn His Pro Phe Leu Phe
355 360 365

Val Met Lys Gln Asn Lys Thr Asn Ser Ile Leu Phe Phe Gly Arg Val
370 375 380

Ser Ser Pro
385

<210> 21
<211> 367
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

Met Ala Ser Leu Ala Val Ser Ile Asn Gln Phe Ala Leu Glu Phe Ser
1 5 10 15

Lys Lys Leu Ala Glu Ser Ala Glu Gly Arg Asn Ile Phe Phe Ser Pro
20 25 30

Trp Gly Ile Ser Thr Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Thr Lys Gly
35 40 45

WO 02/072769

24/44

PCT/US02/07215

Thr Thr Ala Asp Gln Met Ala Gln Val Leu Gln Phe Ser Ser Val Glu
 50 55 60

Asp Phe Lys Ser Cys Pro Asp Ser Glu Lys Lys Arg Lys Met Glu Phe
 65 70 75 80

Asn Ser Gly Lys Phe Glu Glu Ile Gln Ser Asp Phe Gln Thr Leu Ala
 85 90 95

Ala Glu Ile Leu Lys Pro Gly Asn Ser Tyr Val Leu Lys Thr Ala Asn
 100 105 110

Arg Ile Tyr Gly Glu Lys Thr Tyr Pro Phe His Asn Lys Tyr Leu Glu
 115 120 125

Asp Met Lys Thr Tyr Phe Gly Ala Glu Pro Gln Ser Val Asn Phe Val
 130 135 140

Glu Ala Ser Gly Gln Ile Arg Lys Glu Ile Asn Ser Trp Val Gly Ser
 145 150 155 160

Gln Thr Gly Gly Lys Ile Pro Asn Leu Leu Pro Asp Asp Ser Val Asp
 165 170 175

Thr Lys Thr Lys Met Val Leu Val Asn Ala Leu Tyr Phe Lys Gly Thr
 180 185 190

Trp Glu His Gln Phe Ser Val Lys Ser Thr Thr Glu Arg Pro Phe Arg
 195 200 205

Val Asn Lys Thr Thr Ser Lys Pro Val Gln Met Met Ser Met Lys Gln
 210 215 220

Ser Leu Gln Val Phe His Ile Glu Glu Leu Gln Thr Ile Gly Leu Gln
 225 230 235 240

Leu His Tyr Gln Asn Arg Asp Leu Ser Leu Leu Leu Leu Pro Glu
 245 250 255

Ala Ile Asp Gly Leu Glu Gln Phe Lys Met Glu Glu Ser Tyr Asp Leu
 260 265 270

Lys Ser Ala Leu Lys Gly Met Gly Met Thr Asp Val Phe Ser Gln Ser
 275 280 285

WO 02/072769

25/44

PCT/US02/07215

Lys Ala Asp Phe Ser Asn Met Thr Ser Glu Arg Asn Leu Phe Leu Ser
 290 295 300

Asn Val Phe His Lys Thr Phe Leu Glu Ile Asn Glu Glu Gly Thr Glu
 305 310 315 320

Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ser Glu Ile Ser Val Arg Ile Lys Ala Pro
 325 330 335

Ser Ile Glu Leu Asn Val Asp His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His
 340 345 350

Asn Lys Thr Lys Ser Ile Leu Phe Cys Gly Arg Phe Cys Ser Pro
 355 360 365

<210> 22
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22

Met Asp Ser Leu Gly Thr Ala Ala Thr Gln Phe Leu Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15

Lys Glu Leu Asn Lys Thr Asn Asp Gly Asn Val Phe Phe Ser Pro Val
 20 25 30

Gly Ile Ser Thr Ala Ile Gly Met Ile Ile Leu Gly Thr Arg Gly Ala
 35 40 45

Thr Ala Ser Glu Leu Gln Lys Val Leu Tyr Thr Glu Gln Gly Thr Glu
 50 55 60

Ser Ser Arg Ile Lys Ser Glu Glu Glu Glu Ile Glu Lys Arg Glu Glu
 65 70 75 80

Ile His His Gln Leu Gln Met Leu Leu Thr Glu Ile Ser Lys Phe Ser
 85 90 95

Asn Asp Tyr Asp Leu Ile Ile Ser Asn Arg Leu Phe Gly Glu Lys Thr
 100 105 110

Tyr Leu Phe Leu Gln Lys Tyr Ile Asp Tyr Val Glu Lys Tyr Tyr His
 115 120 125

Ala Ser Leu Glu Pro Val Asp Phe Val Asn Ala Ala Asp Glu Ser Arg
 130 135 140

WO 02/072769

26/44

PCT/US02/07215

Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Lys Val Lys
 145 150 155 160
 Asp Leu Phe Pro Glu Gly Ser Leu Asn Ser Ser Thr Lys Leu Val Leu
 165 170 175
 Ile Asn Thr Val Tyr Phe Lys Gly Leu Trp Asp Arg Glu Phe Lys Lys
 180 185 190
 Glu His Thr Lys Glu Glu Asp Phe Trp Leu Asn Lys Asn Leu Ser Lys
 195 200 205
 Pro Val Gln Met Met Ala Leu Cys Ser Ser Phe Asn Phe Thr Phe Leu
 210 215 220
 Glu Asp Leu Gln Ala Lys Ile Val Gly Ile Pro Tyr Lys Asn Asn Asp
 225 230 235 240
 Ile Ser Met Phe Val Leu Leu Pro Asn Asp Ile Asp Gly Leu Glu Lys
 245 250 255
 Ile Met Asp Lys Met Ser Pro Glu Lys Leu Val Glu Trp Thr Ser Pro
 260 265 270
 Gly His Leu Glu Gln Arg Arg Val Asp Leu Arg Leu Pro Arg Leu Gln
 275 280 285
 Val Glu Glu Thr Tyr Asp Leu Glu Pro Val Leu Glu Ala Val Gly Ile
 290 295 300
 His Ser Ala Phe Ser Glu His Ala Asp Tyr Ser Gly Met Ser Ala Arg
 305 310 315 320
 Ser Gly Leu His Ala Gln Asn Phe Leu His Arg Ser Phe Leu Val Val
 325 330 335
 Thr Glu Glu Gly Val Glu Ala Thr Ala Gly Thr Gly Val Gly Leu Lys
 340 345 350
 Val Ser Ser Ala Ala Ser Cys Glu Leu Val His Cys Asn His Pro Phe
 355 360 365
 Leu Phe Phe Ile Arg His Arg Glu Ser Asp Ser Ile Leu Phe Phe Gly
 370 375 380

WO 02/072769

27/44

PCT/US02/07215

Lys Phe Ser Ser Pro
385

<210> 23
<211> 417
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Ser Tyr Leu Tyr Gly Val Leu Phe Ala Val Gly Leu Cys Ala
1 5 10 15

Pro Ile Tyr Cys Val Ser Pro Ala Asn Ala Pro Ser Ala Tyr Pro Arg
20 25 30

Pro Ser Ser Thr Lys Ser Thr Pro Ala Ser Gln Val Tyr Ser Leu Asn
35 40 45

Thr Asp Phe Ala Phe Arg Leu Tyr Arg Arg Leu Val Leu Glu Thr Pro
50 55 60

Ser Gln Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Val Ser Thr Ser Leu Ala
65 70 75 80

Met Leu Ser Leu Gly Ala His Ser Val Thr Lys Thr Gln Ile Leu Gln
85 90 95

Gly Leu Gly Phe Asn Leu Thr His Thr Pro Glu Ser Ala Ile His Gln
100 105 110

Gly Phe Gln His Leu Val His Ser Leu Thr Val Pro Ser Lys Asp Leu
115 120 125

Thr Leu Lys Met Gly Ser Ala Leu Phe Val Lys Lys Glu Leu Gln Leu
130 135 140

Gln Ala Asn Phe Leu Gly Asn Val Lys Arg Leu Tyr Glu Ala Glu Val
145 150 155 160

Phe Ser Thr Asp Phe Ser Asn Pro Ser Ile Ala Gln Ala Arg Ile Asn
165 170 175

Ser His Val Lys Lys Lys Thr Gln Gly Lys Val Val Asp Ile Ile Gln
180 185 190

Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Met Val Leu Val Asn His Ile Phe Phe

WO 02/072769 28/44 PCT/US02/07215

195 200 205

Lys Ala Lys Trp Glu Lys Pro Phe His Leu Glu Tyr Thr Arg Lys Asn
 210 215 220

Phe Pro Phe Leu Val Gly Glu Gln Val Thr Val Gln Val Pro Met Met
 225 230 235 240

His Gln Lys Glu Gln Phe Ala Phe Gly Val Asp Thr Glu Leu Asn Cys
 245 250 255

Phe Val Leu Gln Met Asp Tyr Lys Gly Asp Ala Val Ala Phe Phe Val
 260 265 270

Leu Pro Ser Lys Gly Lys Met Arg Gln Leu Glu Gln Ala Leu Ser Ala
 275 280 285

Arg Thr Leu Ile Lys Trp Ser His Ser Leu Gln Lys Arg Trp Ile Glu
 290 295 300

Val Phe Ile Pro Arg Phe Ser Ile Ser Ala Ser Tyr Asn Leu Glu Thr
 305 310 315 320

Ile Leu Pro Lys Met Gly Ile Gln Asn Ala Phe Asp Lys Asn Ala Asp
 325 330 335

Phe Ser Gly Ile Ala Lys Arg Asp Ser Leu Gln Val Ser Lys Ala Thr
 340 345 350

His Lys Ala Val Leu Asp Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala
 355 360 365

Ala Thr Thr Thr Lys Phe Ile Val Arg Ser Lys Asp Gly Pro Ser Tyr
 370 375 380

Phe Thr Val Ser Phe Asn Arg Thr Phe Leu Met Met Ile Thr Asn Lys
 385 390 395 400

Ala Thr Asp Gly Ile Leu Phe Leu Gly Lys Val Glu Asn Pro Thr Lys
 405 410 415

Ser

<210> 24
 <211> 403

WO 02/072769

29/44

PCT/US02/07215

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

```

Met Ala Ser Tyr Leu Tyr Gly Val Leu Phe Ala Val Gly Leu Cys Ala
1      5      10      15

Pro Ile Tyr Cys Val Ser Pro Ala Asn Ala Pro Ser Ala Tyr Pro Arg
      20      25      30

Pro Ser Ser Thr Lys Ser Thr Pro Ala Ser Gln Val Tyr Ser Leu Asn
      35      40      45

Thr Asp Phe Ala Phe Arg Leu Tyr Arg Arg Leu Val Leu Glu Thr Pro
      50      55      60

Ser Gln Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Val Ser Thr Ser Leu Ala
      65      70      75      80

Met Leu Ser Leu Gly Ala His Ser Val Thr Lys Thr Glu Ile Leu Gln
      85      90      95

Gly Leu Gly Phe Asn Leu Thr His Thr Pro Glu Ser Ala Ile His Gln
      100     105     110

Gly Phe Gln His Leu Val His Ser Leu Thr Val Pro Ser Lys Asp Leu
      115     120     125

Thr Leu Lys Met Gly Ser Ala Leu Phe Val Lys Lys Glu Leu Gln Leu
      130     135     140

Gln Ala Asn Phe Leu Gly Asn Val Lys Arg Leu Tyr Glu Ala Glu Val
      145     150     155     160

Phe Ser Thr Asp Phe Ser Asn Pro Ser Ile Ala Gln Ala Arg Ile Asn
      165     170     175

Ser His Val Lys Lys Lys Thr Gln Gly Lys Val Val Asp Ile Ile Gln
      180     185     190

Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Met Val Leu Val Asn His Ile Phe Phe
      195     200     205

Lys Ala Lys Trp Glu Lys Pro Phe His Pro Glu Tyr Thr Arg Lys Asn
      210     215     220

```

WO 02/072769

30/44

PCT/US02/07215

Phe Pro Phe Leu Val Gly Glu Gln Val Thr Val His Val Pro Met Met
 225 230 235 240
 His Gln Lys Glu Gln Phe Ala Phe Gly Val Asp Thr Glu Leu Asn Cys
 245 250 255
 Phe Val Leu Gln Met Asp Tyr Lys Gly Asp Ala Val Ala Phe Phe Val
 260 265 270
 Leu Pro Ser Lys Gly Lys Met Arg Gln Leu Glu Gln Ala Leu Ser Ala
 275 280 285
 Arg Thr Leu Arg Lys Trp Ser His Ser Leu Gln Lys Arg Trp Ile Glu
 290 295 300
 Val Phe Ile Pro Arg Phe Ser Ile Ser Ala Ser Tyr Asn Leu Glu Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Pro Lys Met Gly Ile Gln Asn Ala Phe Asp Lys Asn Ala Asp
 325 330 335
 Phe Ser Gly Ile Ala Lys Arg Asp Ser Leu Gln Val Ser Lys Ala Thr
 340 345 350
 His Lys Ala Val Leu Asp Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala
 355 360 365
 Ala Thr Thr Thr Lys Phe Ile Val Arg Ser Lys Asp Gly Pro Ser Tyr
 370 375 380
 Phe Thr Val Ser Phe Asn Arg Thr Phe Leu Met Met Ile Thr Asn Lys
 385 390 395 400
 Ala Thr Asp

<210> 25
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Trp Ile Glu Val Phe Ile Pro Arg Phe Ser Ile Ser Ala Ser Tyr Asn
 1 5 10 15
 Leu Glu Thr Ile Leu Pro Lys Met Gly Ile Gln Asn Ala Phe Asp Lys
 20 25 30

WO 02/072769

31/44

PCT/US02/07215

Asn Ala Asp Phe Ser Gly Ile Ala Lys Arg Asp Ser Leu Gln
35 40 45

<210> 26
<211> 179
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Ala Phe Ile Ala Ala Leu Gly Leu Leu Met Ala Gly Ile Cys Pro
1 5 10 15

Ala Val Leu Cys Asp Gly Thr Leu Gly Arg Asp Thr Leu Ser His Glu
20 25 30

Asp His Gly Lys Gly Arg Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Ala Ser Ser
35 40 45

Asn Thr Asp Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Lys Lys Leu Ala Leu Arg Asn
50 55 60

Pro Asp Lys Asn Val Val Phe Ser Pro Leu Ser Ile Ser Ala Ala Leu
65 70 75 80

Thr Ile Leu Ser Leu Gly Ala Lys Asp Ser Thr Met Glu Glu Ile Leu
85 90 95

Glu Gly Leu Lys Phe Asn Leu Thr Glu Ile Thr Glu Glu Glu Ile His
100 105 110

Gln Gly Phe Gly His Leu Leu Gln Arg Leu Ser Gln Pro Glu Asp Gln
115 120 125

Val Glu Ile Asn Thr Gly Ser Ala Leu Phe Ile Asp Lys Glu Gln Pro
130 135 140

Ile Leu Ser Glu Phe Gln Glu Lys Thr Arg Ala Leu Tyr Gln Ala Glu
145 150 155 160

Ala Phe Ile Ala Asp Phe Lys Gln Pro Asn Glu Ala Lys Lys Leu Ile
165 170 175

Asn Asp Tyr

WO 02/072769

32/44

PCT/US02/07215

<210> 27
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

```

Met Glu Gly His Gly Leu Pro Cys Pro Ser Leu Gly Leu Leu Phe Trp
 1             5             10             15

Cys Trp Gly Arg Glu Cys Gln Arg His Glu Glu Gly Gly Ser Ile Arg
      20             25             30

Tyr Leu Val Pro Ser Lys Ser Pro Thr Ser Lys Val Ile Ser Gly Ile
      35             40             45

Pro Gln Cys Asp Lys Gly Leu Asp Glu Gly Phe Leu Ala Gly Pro Pro
      50             55             60

Gly Ser Arg Asn Leu Asp Arg Val Val Glu Thr Ser Pro Ala Glu Thr
 65             70             75             80

Ala Ile Ala Ser Phe Leu Ser Val Leu Ser Cys Asp Ser Lys Gln Ile
      85             90             95

Leu Leu His Phe Phe Lys Arg Gly Ala His Glu Cys Trp Arg Pro Thr
     100            105            110

Arg Thr Glu Ser Ser Lys Glu Thr Cys Asn Ser Asp Thr Lys Val Cys
     115            120            125

Glu Tyr Val Ala His Ser Arg Glu Glu Gly Leu Glu Lys Arg Glu Asp
     130            135            140

Val Phe Tyr Leu Gly Pro Leu Pro Lys Ile Gly Thr Ile Val Leu Ser
     145            150            155            160

Gly Leu Ala Cys Lys Leu Leu Gln Glu Gly Thr Leu Pro Ala Ser Met
     165            170            175

Pro Pro Phe Leu Ile Thr Leu Phe Leu Phe His Ser Cys Cys Leu Arg
     180            185            190

Ala Asn Gly His Leu Arg Glu Gly Met Thr Leu Leu Lys Thr Glu Phe
     195            200            205

Ala Leu His Leu Tyr Gln Ser Val Ala Ala Cys Arg Asn Glu Thr Asn
     210            215            220

```

WO 02/072769

33/44

PCT/US02/07215

Phe Val Ile Ser Pro Ala Gly Val Ser Leu Pro Leu Glu Ile Leu Gln
225 230 235 240

Phe Gly Ala Glu Gly Ser Thr Gly Gln Gln Leu Ala Asp Ala Leu Gly
245 250 255

Tyr Thr Val His Asp Lys Arg Val Lys Asp Phe Leu His Ala Val Tyr
260 265 270

Ala Thr Leu Pro Thr Ser Ser Gln Gly Thr Glu Met Glu Leu Ala Cys
275 280 285

Ser Leu Phe Val Gln Val Gly Thr Pro Leu Ser Pro Cys Phe Val Glu
290 295 300

His Val Ser Trp Trp Ala Asn Ser Ser Leu Glu Pro Ala Asp Leu Ser
305 310 315 320

Glu Pro Asn Ser Thr Ala Ile Gln Thr Ser Glu Gly Ala Ser Arg Glu
325 330 335

Thr Ala Gly Gly Gly Pro Ser Glu Gly Pro Gly Gly Trp Pro Trp Glu
340 345 350

Gln Val Ser Ala Ala Phe Ala Gln Leu Val Leu Val Ser Thr Met Ser
355 360 365

Phe Gln Gly Thr Trp Arg Lys Arg Phe Ser Ser Thr Asp Thr Gln Ile
370 375 380

Leu Pro Phe Thr Cys Ala Tyr Gly Leu Val Leu Gln Val Pro Met Met
385 390 395 400

His Gln Thr Thr Glu Val Asn Tyr Gly Gln Phe Gln Asp Thr Ala Gly
405 410 415

His Gln Val Gly Val Leu Glu Leu Pro Tyr Leu Gly Ser Ala Val Ser
420 425 430

Leu Phe Leu Val Leu Pro Arg Asp Lys Asp Thr Pro Leu Ser His Ile
435 440 445

Glu Pro His Leu Thr Ala Ser Thr Ile His Leu Trp Thr Thr Ser Leu
450 455 460

WO 02/072769

34/44

PCT/US02/07215

Arg Arg Ala Arg Met Asp Val Phe Leu Pro Arg Phe Arg Ile Gln Asn
465 470 475 480

Gln Phe Asn Leu Lys Ser Ile Leu Asn Ser Trp Gly Val Thr Asp Leu
485 490 495

Phe Asp Pro Leu Lys Ala Asn Leu Lys Gly Ile Ser Gly Gln Asp Gly
500 505 510

Phe Tyr Val Ser Glu Ala Ile His Lys Ala Lys Ile Glu Val Leu Glu
515 520 525

Glu Gly Thr Lys Ala Ser Gly Ala Thr Gly Phe Ile Gln Lys Asn Val
530 535 540

Leu Lys Val Met Ser Asn Leu
545 550

<210> 28
<211> 376
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Pro Phe Leu Ile Thr Leu Phe Leu Phe His Ser Cys Cys Leu Arg
1 5 10 15

Ala Asn Gly His Leu Arg Glu Gly Met Thr Leu Leu Lys Thr Glu Phe
20 25 30

Ala Leu His Leu Tyr Gln Ser Val Ala Ala Cys Arg Asn Glu Thr Asn
35 40 45

Phe Val Ile Ser Pro Ala Gly Val Ser Leu Pro Leu Glu Ile Leu Gln
50 55 60

Phe Gly Ala Glu Gly Ser Thr Gly Gln Gln Leu Ala Asp Ala Leu Gly
65 70 75 80

Tyr Thr Val His Ala Lys Ala Pro Ser Met Glu Leu Ala Cys Ser Leu
85 90 95

Phe Val Gln Val Gly Thr Pro Leu Ser Pro Cys Phe Val Glu His Val
100 105 110

Ser Trp Trp Ala Asn Ser Ser Leu Glu Pro Ala Asp Leu Ser Glu Pro

WO 02/072769

35/44

PCT/US02/07215

115 120 125
 Asn Ser Thr Ala Ile Gln Thr Ser Glu Gly Ala Ser Arg Glu Thr Ala
 130 135 140
 Gly Gly Gly Pro Ser Glu Gly Pro Gly Gly Trp Pro Trp Glu Gln Val
 145 150 155 160
 Ser Ala Ala Phe Ala Gln Leu Val Leu Val Ser Thr Met Ser Phe Gln
 165 170 175
 Gly Thr Trp Arg Lys Arg Phe Ser Ser Thr Asp Thr Gln Ile Leu Pro
 180 185 190
 Phe Thr Cys Ala Tyr Gly Leu Val Leu Gln Val Pro Met Met His Gln
 195 200 205
 Thr Thr Glu Val Asn Tyr Gly Gln Phe Gln Asp Thr Ala Gly His Gln
 210 215 220
 Val Gly Val Leu Glu Leu Pro Tyr Leu Gly Ser Ala Val Ser Leu Phe
 225 230 235 240
 Leu Val Leu Pro Arg Asp Lys Asp Thr Pro Leu Ser His Ile Glu Pro
 245 250 255
 His Leu Thr Ala Ser Thr Ile His Leu Trp Thr Thr Ser Leu Arg Arg
 260 265 270
 Ala Arg Met Asp Val Phe Leu Pro Arg Phe Arg Ile Gln Asn Gln Phe
 275 280 285
 Asn Leu Lys Ser Ile Leu Asn Ser Trp Gly Val Thr Asp Leu Phe Asp
 290 295 300
 Pro Leu Lys Ala Asn Leu Lys Gly Ile Ser Gly Gln Asp Gly Phe Tyr
 305 310 315 320
 Val Ser Glu Ala Ile His Lys Ala Lys Ile Glu Val Leu Glu Glu Gly
 325 330 335
 Thr Lys Ala Ser Gly Ala Thr Ala Leu Leu Leu Lys Arg Ser Arg
 340 345 350
 Ile Pro Ile Phe Lys Ala Asp Arg Pro Phe Ile Tyr Phe Leu Arg Glu
 355 360 365

WO 02/072769

36/44

PCT/US02/07215

Pro Asn Thr Ala Phe Leu Ser Phe
370 375

<210> 29
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Trp Lys Arg Met Ala Gln Ile Leu Trp Thr Pro Gln Met Ser Gly Phe
1 5 10 15

Arg Glu Lys Leu Leu Arg Ala Cys Trp Gln Arg His Phe Ser Gln Lys
20 25 30

Ser Pro Cys Gly Ala Gly Val Arg Gly Val Pro Gly Pro Ser Thr Met
35 40 45

Ser Ala Leu Ser Glu Ala Asn Gly Ser Ser His His Leu Leu Lys Glu
50 55 60

Pro Tyr Glu Glu Asn Pro Ser Cys Asn Val Leu Leu Ser Val Pro Ser
65 70 75 80

Val Ser Ser Ala Leu Ala Met Leu Phe Leu Gly Val Glu Gly Asn Val
85 90 95

Ala Ala Gln Met Ala Gln Ala Arg Arg Pro Pro Leu His Lys Glu Glu
100 105 110

Glu Leu Phe Val Ala Ile Arg Val Val Cys Gln Lys Phe Leu Asp Phe
115 120 125

Leu Pro Ser Ser Thr Cys Arg Gly Gly Val Thr Ser Ile Lys Ser Tyr
130 135 140

Pro Pro Ile Val Ile Asn Arg Lys Leu Asp Asn Val Tyr Glu Thr Thr
145 150 155 160

Gly Asp Thr Phe His Ile Gly Tyr Asp Trp Ser Ile Ile Leu Glu Gly
165 170 175

Arg Pro Thr Asn Ala Gly Arg Pro Pro Ser Thr Arg Ala Ser Ala His
180 185 190

WO 02/072769

37/44

PCT/US02/07215

Val Gln Leu Leu Asn Cys Pro Ala Ser Glu Leu Leu Trp Lys Met Ser
 195 200 205

Leu Tyr Met Lys Lys Ser Ala Ser Gly Gln Ser Gln Ala Gln Trp Ile
 210 215 220

Ala Lys Met Trp Lys Ser Pro Arg Phe Lys Leu Gln Glu Asn Arg Ser
 225 230 235 240

Met Glu Ser Ala Leu Ser Cys Trp Gly Ile Thr Asp Ala Phe Asp
 245 250 255

<210> 30
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Ser Ala Leu Ser Glu Ala Asn Gly Ser Ser His His Leu Leu Lys
 1 5 10 15

Glu Pro Tyr Glu Glu Asn Pro Ser Cys Asn Val Leu Leu Ser Val Pro
 20 25 30

Ser Val Ser Ser Ala Leu Ala Met Leu Phe Leu Gly Val Glu Gly Asn
 35 40 45

Val Ala Ala Gln Met Ala Gln Ala Arg Arg Pro Pro Leu His Lys Glu
 50 55 60

Glu Glu Leu Phe Val Ala Ile Arg Val Val Cys Gln Lys Phe Leu Asp
 65 70 75 80

Phe Leu Pro Ser Ser Thr
 85

<210> 31
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Trp Lys Met Ser Leu Tyr Met Lys Lys Ser Ala Ser Gly Gln Ser Gln
 1 5 10 15

Ala Gln Trp Ile Ala Lys Met Trp Lys Ser Pro Arg Phe Lys Leu Glu
 20 25 30

WO 02/072769

38/44

PCT/US02/07215

Glu Asn Arg Ser Met Glu Ser Ala Leu Ser Cys Trp Gly Ile Thr Asp
 35 40 45

Ala Phe Asp
 50

<210> 32
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Leu Ala Thr Glu Val Lys Lys Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Thr Ala Ala Pro Gly Thr Ala Glu Lys Leu Ser Pro Lys Ala
 20 25 30

Ala Thr Leu Ala Glu His Ser Ala Gly Leu Ala Phe Ser Leu Tyr Gln
 35 40 45

Ala Met Ala Lys Asp Gln Ala Val Glu Asn Ile Leu Val Ser Pro Val
 50 55 60

Val Val Ala Ser Ser Leu Gly Leu Val Ser Leu Gly Gly Lys Ala Thr
 65 70 75 80

Thr Ala Ser Glu Ala Lys Ala Val Leu Ser Ala Lys Gln Leu Ser Asp
 85 90 95

Glu Glu Val His Ala Gly Val Gly Glu Pro Leu Arg Ser Leu Ser Asn
 100 105 110

Ser Thr Ala Arg Asn Val Thr Trp Lys Leu Cys Ser Arg Leu Ser Lys
 115 120 125

Gln His Tyr Asn Cys Glu His Ser Lys Ile Asn Phe His Asp Lys Arg
 130 135 140

Ser Ala Leu Gln Ser Ile His Glu Trp Ala Val Gln Thr Thr Asp Gly
 145 150 155 160

Lys Leu Pro Lys Val Thr Lys Asp Met Glu Cys Met Asp Gly Ala Leu
 165 170 175

Leu Val Asn Thr Met Phe Phe Lys Pro His Trp Asn Glu Lys Phe His

WO 02/072769
39/44
PCT/US02/07215

180 185 190

His Lys Met Val Glu Asn Arg Gly Phe Met Val Thr Arg Phe Tyr Thr
195 200 205

Val Gly Val Met Val Met His Gln Thr Gly Leu Tyr Asn Tyr Tyr Asp
210 215 220

Asn Glu Lys Glu Lys Leu Gln Ile Val Glu Met Pro Leu Ala His Lys
225 230 235 240

Leu Ser Ser Leu Ile Ile Leu Met Pro His His Val Glu Pro Leu Glu
245 250 255

Ala Leu Lys Ser Trp Leu Gly Leu Thr Glu Ala Ile Asp Lys Asn Lys
260 265 270

Ala Asn Leu Ser Arg Met Pro His Lys Lys Asp Leu Tyr Leu Thr Ser
275 280 285

Val Phe His Ala Thr Ala Phe Glu Leu Asp Thr Asp Gly Asn Ser Phe
290 295 300

Asp Gln Asp Ile Tyr Gly Ser Lys Glu Leu Arg Ser Pro Lys Leu Phe
305 310 315 320

Tyr Ser Asp His Pro Phe Ile Phe Leu Val Trp Asp Thr Gln Ser Gly
325 330 335

Ser Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Val Arg Pro Lys Val Asp Lys Met
340 345 350

Gln Asp Glu Phe
355

<210> 33
<211> 409
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (293)..(293)
<223> unsure

<400> 33

Ala Phe Cys Leu Leu Glu Ala Ala Leu Ala Ala Glu Val Lys Lys Pro

WO 02/072769 40/44 PCT/US02/07215

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala Glu Lys Leu Ser Pro Lys Ala
20 25 30

Ala Thr Leu Ala Glu Arg Ser Ala Gly Leu Ala Phe Ser Leu Tyr Gln
35 40 45

Ala Met Ala Lys Asp Gln Ala Val Glu Asn Ile Leu Val Ser Pro Val
50 55 60

Val Val Ala Ser Ser Leu Gly Leu Val Ser Leu Gly Gly Lys Ala Thr
65 70 75 80

Thr Ala Ser Gln Ala Lys Ala Val Leu Ser Ala Glu Gln Leu Arg Asp
85 90 95

Glu Glu Val His Ala Gly Leu Gly Glu Leu Leu Arg Ser Leu Ser Asn
100 105 110

Ser Thr Ala Arg Asn Val Thr Trp Lys Leu Gly Ser Arg Leu Tyr Gly
115 120 125

Pro Ser Ser Val Ser Phe Ala Asp Asp Phe Val Arg Ser Ser Lys Gln
130 135 140

His Tyr Asn Cys Glu His Ser Lys Ile Asn Phe Arg Asp Lys Arg Ser
145 150 155 160

Ala Leu Gln Ser Ile Asn Glu Trp Ala Ala Gln Thr Thr Asp Gly Lys
165 170 175

Leu Pro Glu Val Thr Lys Asp Val Glu Arg Thr Asp Gly Ala Leu Leu
180 185 190

Val Asn Ala Met Phe Phe Lys Pro His Trp Asp Glu Lys Phe His His
195 200 205

Lys Met Val Asp Asn Arg Gly Phe Met Val Thr Arg Ser Tyr Thr Val
210 215 220

Gly Val Met Met Met His Arg Thr Gly Leu Tyr Asn Tyr Tyr Asp Asp
225 230 235 240

Glu Lys Glu Lys Leu Gln Ile Val Glu Met Pro Leu Ala His Lys Leu
245 250 255

WO 02/072769

41/44

PCT/US02/07215

Ser Ser Leu Ile Ile Leu Met Pro His His Val Glu Pro Leu Glu Arg
260 265 270

Leu Glu Lys Leu Leu Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ile Trp Met Gly Lys
275 280 285

Met Gln Lys Lys Xaa Val Ala Ile Ser Leu Pro Lys Gly Val Val Glu
290 295 300

Val Thr His Asp Leu Gln Lys His Leu Ala Gly Leu Gly Leu Thr Glu
305 310 315 320

Ala Ile Asp Lys Asn Lys Ala Asp Leu Ser Arg Met Ser Gly Lys Lys
325 330 335

Asp Leu Tyr Leu Ala Ser Val Phe His Ala Thr Ala Phe Glu Leu Asp
340 345 350

Thr Asp Gly Asn Pro Phe Asp Gln Asp Ile Tyr Gly Arg Glu Glu Leu
355 360 365

Arg Ser Pro Lys Leu Phe Tyr Ala Asp His Pro Phe Ile Phe Leu Val
370 375 380

Arg Asp Thr Gln Ser Gly Ser Leu Leu Phe Ile Gly Arg Leu Val Arg
385 390 395 400

Pro Lys Gly Asp Lys Met Arg Asp Glu
405

<210> 34
<211> 351
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Ala Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Leu Ala Thr Glu Val Lys Lys Pro
1 5 10 15

Ala Ala Thr Ala Ala Pro Gly Thr Ala Glu Lys Leu Ser Pro Lys Ala
20 25 30

Ala Thr Leu Ala Glu His Ser Ala Gly Leu Ala Phe Ser Leu Tyr Gln
35 40 45

WO 02/072769

42/44

PCT/US02/07215

Ala Met Ala Lys Asp Gln Ala Val Glu Asn Ile Leu Val Ser Pro Val
 50 55 60
 Val Val Ala Ser Ser Leu Gly Leu Val Ser Leu Gly Gly Lys Ala Thr
 65 70 75 80
 Thr Ala Ser Glu Ala Lys Ala Val Leu Ser Ala Lys Gln Leu Ser Asp
 85 90 95
 Gln Glu Val His Ala Gly Val Gly Glu Pro Leu Arg Ser Leu Ser Asn
 100 105 110
 Tyr Thr Ala Arg Asn Gly Thr Trp Lys Leu Cys Ser Arg Leu Ser Lys
 115 120 125
 Gln His Tyr Asn Cys Glu His Ser Lys Ile Asn Phe His Asp Lys Arg
 130 135 140
 Ser Ala Leu Gln Ser Ile His Glu Trp Ala Val Gln Thr Thr Asp Gly
 145 150 155 160
 Lys Leu Pro Lys Val Thr Lys Asp Met Glu Cys Met Asp Gly Ala Leu
 165 170 175
 Leu Val Asn Thr Met Phe Phe Lys Pro His Trp Asn Glu Lys Phe His
 180 185 190
 His Lys Met Val Glu Asn Arg Gly Phe Met Val Thr Arg Phe Tyr Thr
 195 200 205
 Val Gly Val Met Val Met His Gln Thr Gly Leu Tyr Asn Tyr Tyr Asp
 210 215 220
 Asn Glu Lys Glu Lys Leu Gln Ile Val Glu Met Pro Leu Ala His Lys
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Leu Ile Ile Leu Met Pro His His Lys Leu Leu Ala Arg
 245 250 255
 Leu Gly Leu Thr Glu Ala Ile Asp Lys Asn Lys Ala Asn Leu Ser Arg
 260 265 270
 Met Pro His Lys Lys Asp Leu Tyr Leu Thr Ser Val Phe His Ala Thr
 275 280 285
 Ala Phe Glu Leu Asp Thr Asp Gly Asn Ser Phe Asp Gln Asp Ile Tyr

WO 02/072769 43/44 PCT/US02/07215

290 295 300

Gly Ser Lys Glu Leu Arg Ser Pro Lys Leu Phe Tyr Ser Asp His Pro
 305 310 315 320

Phe Ile Phe Leu Val Trp Asp Thr Gln Ser Gly Ser Leu Leu Phe Thr
 325 330 335

Gly His Leu Val Arg Pro Lys Val Asp Lys Met Gln Asp Glu Phe
 340 345 350

<210> 35
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Lys Asp Gln Ala Val Glu Asn Ile Leu Val Ser Pro Val Val
 1 5 10 15

Val Ala Ser Ser Leu Gly Leu Val Ser Leu Gly Ser Lys Ala Thr Thr
 20 25 30

Ala Ser Glu Ala Lys Ala Val Leu Ser Ala Lys Gln Leu Arg Asp Glu
 35 40 45

Glu Val His Ala Gly Val Gly Glu Pro Leu Arg Ser Leu Ser Asn Ser
 50 55 60

Thr Ala Arg Asn Val Thr Trp Lys Leu Cys Ser Arg Leu Ser Lys Gln
 65 70 75 80

His Tyr Asn Cys Glu His Ser Lys Ile Asn Phe His Asp Lys Arg Ser
 85 90 95

Ala Leu Gln Ser Ile His Glu Trp Ala Val Gln Thr Thr Asp Gly Lys
 100 105 110

Leu Pro Lys Val Thr Lys Asp Met Glu Cys Met Asp Gly Ala Leu Leu
 115 120 125

Val Asn Thr Met Phe Phe Lys Pro His Trp Asn Glu Lys Phe His His
 130 135 140

Lys Met Val Glu Asn Arg Gly Phe Met Val Thr Arg Phe Tyr Thr Val
 145 150 155 160

WO 02/072769

44/44

PCT/US02/07215

Gly Val Met Val Met His Gln Thr Gly Leu Tyr Asn Tyr Tyr Asp Asn
165 170 175

Glu Lys Glu Lys Leu Gln Ile Val Glu Met Pro Leu Ala His Lys Leu
180 185 190

Ser Ser Leu Ile Ile Leu Met Pro His His Lys Leu Leu Ala Arg Leu
195 200 205

Gly Leu Thr Glu Ala Ile Asp Lys Asn Lys Ala Asn Leu Ser Arg Met
210 215 220

Pro His Lys Lys Asp Leu Tyr Leu Thr Ser Val Phe His Ala Thr Ala
225 230 235 240

Phe Glu Leu Asp Thr Asp Gly Asn Ser Phe Asp Gln Asp Ile Tyr Gly
245 250 255

Ser Lys Glu Leu Arg Ser Pro Lys Leu Phe Tyr Ser Asp His Pro Phe
260 265 270

Ile Phe Leu Val Trp Asp Thr Gln Ser Gly Ser Leu Leu Phe Thr Gly
275 280 285

His Leu Val Arg Pro Lys Val Asp Lys Met Gln Asp Glu Phe
290 295 300

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/08	
A 6 1 P 17/08	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/566	A 6 1 K 37/64	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 クラーク, ハワード・アール・ジー

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 4 6, シアトル, マリン・ビュー・ドライブ・サウスウエスト
1 0 8 2 3

(72)発明者 ドゥボーズ, ロバート・エフ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 0 0 6, ベルヴァー, ワンハンドレッドアンドフィフティシックス
・ブレース・サウスイースト 6 1 5 1

(72)発明者 ウィリー, スティーブン・アール

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 1 1 9, シアトル, イレブンス・アベニュー・ウエスト・ナンバ
ー 6 1 5 1 1

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37

FB01 FB03 FB06

4B024 AA01 AA11 BA19 BA31 BA44 CA04 CA12 DA02 GA11 HA06

HA15

4B064 AG23 CA10 CA19 CC24 DA03 DA13

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17 CA18 CA49 CA51

DC32 NA14 ZA542 ZA592 ZA752 ZA892 ZA962 ZB072 ZB132 ZB152
ZB262 ZC202

4H045 AA11 BA10 CA40 DA56 DA75 DA76 EA27 EA51 FA72 FA74