

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 17 年 9 月 2 日 (2005.9.2)

【公表番号】特表 2004-535166 (P2004-535166A)

【公表日】平成 16 年 11 月 25 日 (2004.11.25)

【年通号数】公開・登録公報 2004-046

【出願番号】特願 2002-575305 (P2002-575305)

【国際特許分類第 7 版】

C 1 2 N 15/09
 A 0 1 K 67/027
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 31/713
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 13/08
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00
 C 0 7 K 16/40
 C 1 2 M 1/00
 C 1 2 M 1/34
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 9/64
 C 1 2 Q 1/37
 C 1 2 Q 1/68
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/50
 G 0 1 N 33/68

// C 1 2 P 21/08

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 0 1 K 67/027
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 31/713
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 13/08
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 C 0 7 K 16/40
 C 1 2 M 1/00 A
 C 1 2 M 1/34 Z

C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	9/64	Z
C 1 2 Q	1/37	
C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/68	
C 1 2 N	15/00	F
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】

【提出日】平成16年1月27日(2004.1.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

セリンプロテアーゼ14(CVSP14)のプロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分もしくはそのドメインを含む、実質的に精製された一本鎖または二本鎖ポリペプチドであって、配列番号13で示される完全配列を含まず、かつ、

上記ポリペプチドのCVSP14部分が本質的にCVSP14のプロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分からなる、ポリペプチド。

【請求項2】

配列番号6で示されるアミノ酸配列またはその触媒活性部分を含む、請求項1に記載の精製されたポリペプチド。

【請求項3】

実質的に精製された活性化二本鎖CVSP14ポリペプチドまたはその触媒活性部分。

【請求項4】

配列番号5または12で示されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列；
配列番号5または12で示されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号5または12で示されるヌクレオチド配列と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号6または13で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号6または13で示されるアミノ酸配列と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%または95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

配列番号12で示される配列のスプライス変異体であるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド
からなる群から選択されるポリペプチドを含む、請求項3に記載の実質的に精製された活性化二本鎖CVSP14ポリペプチド。

【請求項5】

請求項1に記載のポリペプチドと少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%の配列同一性を有する実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項6】

実質的にプロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分からなる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドと少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%または95%の配列同一性を有し、かつ、請求項 1 に記載のポリペプチドと同じ基質に対して少なくとも10%の触媒活性を保持する、実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 8】

ヒトポリペプチドである、請求項 1 に記載の実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号6で示されるアミノ酸配列またはその触媒活性部分を含むか、あるいは

(a)配列番号5で示されるヌクレオチド配列；

(b)(a)によってコードされるCVSP14をコードする、哺乳類細胞に存在するmRNA転写物に相補的な核酸と中または高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c)(a)のスプライス変異体をコードするヌクレオチド配列；または

(d)(a)または(b)のヌクレオチド配列の縮重コドンを含むヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

(a)配列番号5または12で示されるヌクレオチド配列を含むプロテアーゼドメインをコードするヌクレオチド配列；

(b)(a)によってコードされるCVSP14をコードする、哺乳類細胞に存在するmRNA転写物に相補的な核酸と中または高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c)(a)または(b)のスプライス変異体をコードするヌクレオチド配列；および

(d)(a)または(b)のヌクレオチド配列の縮重コドンを含むヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 1 に記載の実質的に精製された一本鎖または二本鎖ポリペプチド。

【請求項 11】

プロテアーゼドメイン部分が、配列番号5で示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と、全長の少なくとも約70%にわたって高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、請求項 1 に記載の実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項 12】

プロテアーゼドメイン部分が、配列番号5で示されるヌクレオチド配列またはその少なくとも1つのドメインもしくはそのドメインの触媒活性部分を含む核酸分子と、全長の少なくとも約70%にわたって高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

約50%までのアミノ酸が別のアミノ酸で置換され、かつ、

結果として生じるポリペプチドが非変異型ポリペプチドの少なくとも10%の触媒活性を有する一本鎖または二本鎖ポリペプチドである、
請求項 1 に記載のポリペプチドのミューテイン (mutein) であるポリペプチド。

【請求項 14】

約10%までのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

結果として生じるポリペプチドが非変異型ポリペプチドの少なくとも50%の触媒活性を有する一本鎖または二本鎖ポリペプチドである、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

プロテアーゼドメイン中の遊離システインが別のアミノ酸で置換されている、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

約95%までのアミノ酸が保存されているか、または保存的アミノ酸置換によって置換されている、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 18】

置換アミノ酸がセリンである、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

約50%までのアミノ酸が別のアミノ酸で置換され、かつ、

結果として生じるポリペプチドが非変異型ポリペプチドの少なくとも10%の触媒活性を有する一本鎖または二本鎖ポリペプチドである、

請求項 3 に記載のポリペプチドのミューテインであるポリペプチド。

【請求項 20】

約10%までのアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 21】

結果として生じるポリペプチドが二本鎖ポリペプチドであり、非変異型ポリペプチドの少なくとも50%の触媒活性を有する、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 22】

プロテアーゼドメイン中の遊離システインが別のアミノ酸で置換され、それにより結果として生じるポリペプチドがタンパク質分解活性を示す、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 23】

プロテアーゼドメイン中の遊離システインがセリンで置換されている、請求項 22 に記載のポリペプチド。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 23 のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 25】

請求項 3 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 26】

請求項 6 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 27】

本質的にプロテアーゼドメインからなる、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 28】

(a) 配列番号5または12で示されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号5または12で示されるヌクレオチド配列と、全長の少なくとも約70%にわたって高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

(c) (a) または (b) の縮重コドン

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 24 に記載の核酸分子。

【請求項 29】

請求項 13 のポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 30】

請求項 24 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 31】

発現ベクターである、請求項 30 に記載のベクター。

【請求項 32】

真核ベクターである、請求項 30 に記載のベクター。

【請求項 33】

作動可能なように連結されたヌクレオチド配列によってコードされるいずれかのポリペプチドの分泌を命令するヌクレオチド配列を含む、請求項 31 に記載のベクター。

【請求項 34】

ピキアベクター、哺乳類ベクターまたは大腸菌ベクターである、請求項 30 に記載のベクター。

【請求項 35】

請求項 30 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 36】

原核細胞である、請求項 35 に記載の細胞。

【請求項 37】

真核細胞である、請求項 35 に記載の細胞。

【請求項 38】

細菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞の中から選択される、請求項 35 に記載の細胞。

【請求項 39】

哺乳類細胞である、請求項 35 に記載の細胞。

【請求項 40】

請求項 6 に記載のポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 41】

請求項 40 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 42】

請求項 41 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 43】

請求項 3 に記載のポリペプチドをコードする内在遺伝子とその動物またはその原種の相同組換えまたは挿入突然変異によって欠失または不活性化されている、組換え非ヒト動物。

【請求項 44】

CVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインを含むポリペプチドを産生する方法であって、

請求項 35 に記載の細胞を、コードされているポリペプチドを細胞に発現させる条件下で培養し、さらに

発現したポリペプチドを回収することを含む、方法。

【請求項 45】

上記ポリペプチドが培地中へ分泌される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

上記ポリペプチドが宿主細胞の細胞質で発現する、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

ポリペプチドのプロテアーゼドメインを含むポリペプチドを産生する方法であって、請求項 42 に記載の細胞を、コードされているポリペプチドを細胞に発現させる条件下で培養し、さらに

発現したポリペプチドを回収することを含む、方法。

【請求項 48】

上記ポリペプチドが封入体で発現し、そのポリペプチドをタンパク質分解活性型へと再折りたたみする条件下で上記封入体からポリペプチドを単離することをさらに含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

請求項 1 に記載の CVSP14 のプロテアーゼドメインをコードする連続するヌクレオチド配列に相補的な少なくとも 14 個の連続するヌクレオチドまたは改変ヌクレオチドを含む；または

請求項 1 に記載の CVSP14 のプロテアーゼドメインをコードする連続するヌクレオチド配列に相補的な少なくとも 16 個の連続するヌクレオチドまたは改変ヌクレオチドを含む；ま

たは

請求項 1 に記載の CVSP14 のプロテアーゼドメインをコードする連続するヌクレオチド配列に相補的な少なくとも 30 個の連続するヌクレオチドまたは改変ヌクレオチドを含む、アンチセンス核酸分子。

【請求項 5 0】

配列番号 5 または 12 で示される連続するヌクレオチド配列を含む、請求項 4 9 に記載のアンチセンス分子。

【請求項 5 1】

請求項 1 に記載の CVSP14 をコードするヌクレオチド配列に由来する少なくとも約 21 個の連続するヌクレオチドまたは改変ヌクレオチドを含む、二本鎖 RNA (dsRNA) 分子。

【請求項 5 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドの一本鎖型および/または二本鎖型プロテアーゼドメインと特異的に結合する抗体、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントもしくは誘導体 (なお、この抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である)。

【請求項 5 3】

上記ポリペプチドの酵素活性を阻害する、請求項 5 2 に記載の抗体。

【請求項 5 4】

請求項 1 に記載のポリペプチドの一本鎖型プロテアーゼドメインと特異的に結合する抗体、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントもしくは誘導体 (なお、この抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である)。

【請求項 5 5】

請求項 3 に記載のポリペプチドと特異的に結合する抗体、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントもしくは誘導体 (なお、この抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である)。

【請求項 5 6】

a) 請求項 1 に記載のポリペプチド、および

b) 上記ポリペプチドと直接またはリンカーを介して結合されたターゲッティングエージェント

を含むコンジュゲート。

【請求項 5 7】

上記ターゲッティングエージェントが、

i) コンジュゲートのアフィニティー単離または精製；

ii) コンジュゲートの、表面への結合；

iii) コンジュゲートの検出；および

iv) 選択された組織または細胞へのターゲッティング送達を可能とする、請求項 5 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 8】

a) 請求項 3 に記載のポリペプチド、および

b) 上記ポリペプチドと直接またはリンカーを介して結合されたターゲッティングエージェント

を含むコンジュゲート。

【請求項 5 9】

上記ターゲッティングエージェントが、

i) コンジュゲートのアフィニティー単離または精製；

ii) コンジュゲートの、表面への結合；

iii) コンジュゲートの検出；および

iv) 選択された組織または細胞へのターゲッティング送達を可能とする、請求項 5 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 0】

a) 請求項 6 に記載のポリペプチド、および

b)上記ポリペプチドと直接またはリンカーを介して結合されたターゲッティングエージェント

を含むコンジュゲート。

【請求項 6 1】

上記ターゲッティングエージェントが、

i)コンジュゲートのアフィニティー単離または精製；

ii)コンジュゲートの、表面への結合；

iii)コンジュゲートの検出；および

iv)選択された組織または細胞へのターゲッティング送達

を可能とする、請求項 6 0 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 2】

a)請求項 1 に記載のポリペプチドの触媒活性を阻害する薬剤または処理；および

b)抗腫瘍および抗血管形成処理および薬剤から選択される別の処理または薬剤を含む組合せ。

【請求項 6 3】

上記阻害剤ならびに抗腫瘍および/または抗血管形成剤が単一医薬組成物として調剤されているか、または各々個別の医薬組成物として調剤されている、請求項 6 2 に記載の組合せ。

【請求項 6 4】

上記阻害剤が抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび二本鎖RNA(dsRNA)から選択される、請求項 6 2 に記載の組合せ。

【請求項 6 5】

直接またはリンカーを介して結合された請求項 1 に記載の2以上のポリペプチドを含む固相支持体。

【請求項 6 6】

上記ポリペプチドがアレイを含む、請求項 6 5 に記載の支持体。

【請求項 6 7】

上記ポリペプチドが複数の異なるプロテアーゼドメインを含む、請求項 6 5 に記載の支持体。

【請求項 6 8】

直接またはリンカーを介して結合された請求項 2 4 に記載の2以上の核酸分子またはそのオリゴヌクレオチド部分を含み、そのオリゴヌクレオチドが少なくとも16個のヌクレオチドを含む、固相支持体。

【請求項 6 9】

上記核酸分子がアレイを含む、請求項 6 8 に記載の支持体。

【請求項 7 0】

上記核酸分子が異なるプロテアーゼドメインをコードする複数の分子を含む、請求項 6 8 に記載の支持体。

【請求項 7 1】

CVSP14ポリペプチドのプロテアーゼ活性を調節する化合物を同定する方法であって、

CVSP14ポリペプチドまたはその触媒活性部分と、上記ポリペプチドによってタンパク質分解切断される基質とを、試験化合物またはその複数を加えると同時、加える前、または加えた後に接触させ；

上記試験化合物の存在下で切断された基質の量を測定し、さらに

対照に比べて切断された基質の量に変化をもたらす化合物を選択し、それにより上記ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する

ことを含む、方法。

【請求項 7 2】

上記試験化合物が上記ポリペプチドの活性を調節する小分子、ペプチド、ペプチドミメティクス、天然産物、抗体またはそのフラグメントである、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

複数の試験化合物が同時にスクリーニングされる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

上記ポリペプチドが

(a)配列番号5で示されるヌクレオチド配列；

(b)(a)によってコードされるCVSP14をコードする、哺乳類細胞に存在するmRNA転写物に相補的な核酸配列と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c)(a)または(b)のスプライス変異体をコードするヌクレオチド配列；および

(d)(a)、(b)または(c)のヌクレオチド配列の縮重コドンを含むヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドから本質的になる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 5】

上記ポリペプチドが

配列番号5で示されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号12で示されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号5または12で示されるヌクレオチド配列と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号6のアミノ酸として示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

配列番号6または13で示される配列のアミノ酸配列と少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%または95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；および

配列番号12で示される配列のスプライス変異体であるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドから本質的になる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 6】

切断された基質の量の変化が、試験化合物の存在下で切断された基質の量と試験化合物の不在下で切断された基質の量を比較することで評価される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

複数のポリペプチドが直接またはリンカーを介して固相支持体に連結されている、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 8】

上記ポリペプチドがアレイを含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 9】

CVSP14ポリペプチドの、一本鎖および/もしくは二本鎖プロテアーゼドメインと、かつ/または一本鎖もしくは二本鎖ポリペプチドと、かつ/またはその一本鎖もしくは二本鎖型のタンパク質分解活性部分と特異的に結合する化合物を同定する方法であって、

CVSP14ポリペプチドまたはそのタンパク質分解活性部分と試験化合物またはその複数を、その結合を助ける条件下で接触させ；

a)一本鎖もしくは二本鎖型の上記ポリペプチドと、またはその一本鎖型と、もしくは二本鎖型と、またはその一本鎖もしくは二本鎖型のタンパク質分解活性部分と特異的に結合する試験化合物を同定するか、あるいは

b)一本鎖もしくは二本鎖型の上記ポリペプチドと、またはその一本鎖もしくは二本鎖型と、またはその一本鎖もしくは二本鎖型のタンパク質分解活性部分と結合することが既知である化合物の結合を阻害する試験化合物を同定する(なおここで、上記既知化合物は試験化合物の前、同時または後に上記ポリペプチドと接触させる)かのいずれかを行うことを含む、方法。

【請求項 8 0】

上記ポリペプチドが直接またはリンカーを介して間接的に固相支持体に連結されている、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

上記試験化合物が小分子、ペプチド、ペプチドミメティクス、天然産物、抗体またはそのフラグメントである、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 82】

複数の試験物質が同時にスクリーニングされる、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 83】

複数のポリペプチドが固相支持体に連結されている、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 84】

上記ポリペプチドが

(a)配列番号5で示されるヌクレオチド配列；

(b)(a)によってコードされるCVSP14をコードする、哺乳類細胞に存在するmRNA転写物に相補的な核酸配列と中または高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c)(a)または(b)のスプライス変異体をコードするヌクレオチド配列；または

(d)(a)、(b)または(c)のヌクレオチド配列の縮重コドンを含むヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドから本質的になる、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 85】

チモーゲン型のCVSP14のアクチベーターを同定する方法であって、

チモーゲン型のCVSP14ポリペプチドまたはそのタンパク質分解活性部分と活性化型のポリペプチドの基質を接触させ；

試験化合物を加え(なお、この試験化合物は基質添加の前、後またはそれと同時に加える)；さらに

上記基質の切断を検出し、それにより上記チモーゲンを活性化する化合物を同定することを含む、方法。

【請求項 86】

上記基質が色素産生基質である、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

上記基質がL-ピログルタミル-L-プロリル-L-アルギニン-p-ニトロアニリンヒドロクロリドである、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

上記試験化合物が小分子、核酸またはポリペプチドである、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 89】

上記ポリペプチドが配列番号13で示される完全な配列を含まず、かつ、

上記ポリペプチドのCVSP14部分がCVSP14のプロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分から本質的になる、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 90】

哺乳類において新生物形成疾患を治療または予防する方法であって、有効量の請求項 1 のポリペプチドのタンパク質分解活性阻害剤を哺乳類に投与することを含む、方法。

【請求項 91】

上記阻害剤が上記ポリペプチドと特異的に結合する抗体、またはその結合ドメインを含む抗体のフラグメントもしくは誘導体である(なお、この抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である)、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

哺乳類において新生物形成疾患を治療または予防する方法であって、有効量の請求項 3 のポリペプチドの阻害剤を哺乳類に投与することを含む、方法。

【請求項 93】

腫瘍の発生、増殖または進行を阻害する、または悪性もしくは前悪性症状を処置する方法であって、チモーゲン型のCVSP14ポリペプチドもしくはそのタンパク質分解活性部分の

活性化を阻害する、または活性化型のCVSP14もしくはそのタンパク質分解活性部分の活性を阻害する薬剤を投与することを含む、方法。

【請求項 9 4】

上記症状が乳房、子宮頸部、前立腺、肺、卵巣または大腸の症状である、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

上記薬剤がアンチセンスオリゴヌクレオチド、二本鎖RNA(dsRNA)または抗体である、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 6】

抗腫瘍または抗血管形成治療または薬剤から選択される別の治療または薬剤を投与することをさらに含む、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 7】

一本鎖もしくは二本鎖型のCVSP14ポリペプチドと、または一本鎖もしくは二本鎖型のCVSP14ポリペプチドのタンパク質分解活性部分と結合する化合物を同定する方法であって、試験化合物と両形態とを接触させ；

上記化合物がどの形態と結合するか判定し；さらに

もし化合物が一方の形態のポリペプチドと結合する場合、その化合物が以下の特性：

(i)一本鎖チモーゲン型のポリペプチドの活性を阻害する；

(ii)二本鎖または一本鎖型の活性を阻害する；および

(iii)上記ポリペプチドの二量体形成を阻害する

のうち少なくとも1つを有するかどうかをさらに判定することを含む、方法。

【請求項 9 8】

新生物形成疾患を検出する方法であって、生体サンプルにおいて請求項 1 のポリペプチドを含むポリペプチドを検出し、その検出量が新生物形成疾患を持たない被験体から検出されたポリペプチドの量と異なる、方法。

【請求項 9 9】

上記生体サンプルが血液、尿、唾液、涙、滑液、汗、間質液、濃脊髄液、腹水、腫瘍組織生検および循環腫瘍細胞からなる群から選択される、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

被験体において前悪性病巣、悪性症状、またはその他の病態の存在を診断する方法であって、

被験体から生体サンプルを得；さらに

生体サンプルを二本鎖および/または一本鎖型のCVSP14ポリペプチドと結合する検出可能な薬剤に曝す

ことを含み、上記病態が二本鎖および/または一本鎖型の有無によって特徴付けられる、方法。

【請求項 1 0 1】

腫瘍の進行および/または治療の有効性をモニタリングする方法であって、身体組織または体液サンプルにおいてCVSP14ポリペプチドを検出し、かつ/またはそのレベルを定量することを含む、方法。

【請求項 1 0 2】

上記腫瘍が乳房、子宮頸部、前立腺、肺、卵巣または大腸の腫瘍である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

上記体液が血液、尿、汗、唾液、脳脊髄液および滑液である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

CVSP14ポリペプチドのプロテアーゼ活性を調節する化合物を同定する方法であって、

請求項 1 のポリペプチドまたはそのタンパク質分解活性部分と上記ポリペプチドによっ

てタンパク質分解切断される基質とを、試験化合物またはその複数を添加すると同時に、またはその前もしくは後に接触させ；

上記試験化合物の存在下で切断される基質の量を測定し；さらに

対照と比較して切断された基質の量に変化をもたらす化合物を選択する

ことを含み、それにより上記ポリペプチドの活性を調節する化合物が同定される、方法。

【請求項 105】

請求項 3 のポリペプチドをコードする異種核酸を含む、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 106】

配列番号 13 のアミノ酸 1～25 から本質的になる CVSP14 ポリペプチド部分を含むポリペプチド。

【請求項 107】

請求項 106 のポリペプチドをコードする核酸分子。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

本明細書ではまた、CVSP14 ポリペプチドおよび CVSP14 のプロテアーゼドメインを一本鎖型または活性化型で含む製品も提供される。これらの製品は a) パッケージング材料、b) ポリペプチド (またはコード核酸)、特にその一本鎖プロテアーゼドメイン、および c) その製品が CVSP14 ポリペプチド活性のモジュレーターを同定するアッセイでの用途のためのものであることを示すラベルを含む製品も提供される。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0090】

本明細書において異種 (heterologous) 核酸とは、in vivo ではそれが発現される細胞によっては本来産生されない、あるいは転写、翻訳またはその他の調節可能な生化学的プロセスを変化させることにより内在性核酸 (DNA など) の発現を変化させるメディエーターを媒介またはコードするタンパク質をコードする核酸 (DNA が RNA をコードする場合) である。異種核酸 (DNA など) はまた、外来核酸 (DNA など) と呼ぶこともできる。当業者ならばそれを発現する細胞に対して異種または外来と認識する、またはみなすであろう DNA などの核酸はいずれも本明細書においては異種核酸に含まれ、異種核酸には外から加えたものであるが、内生的にも発現する核酸も含まれる。異種核酸の例としては、限定されるものではないが、薬剤耐性を付与するタンパク質などの追跡可能なマーカータンパク質をコードする核酸、抗癌剤、酵素およびホルモンなど治療上有効な物質をコードする核酸、および抗体などその他のタイプのタンパク質をコードする DNA などの核酸が挙げられる。異種核酸によってコードされる抗体はその異種核酸が導入された細胞の表面に分泌または発現させることができる。異種核酸は一般にそれが導入された細胞にとっては内在的なものではなく、別の細胞から得られたものであるか、合成によって作製されたものである。必ずしもそうではないが一般に、このような核酸はそれが発現する細胞によっては本来産生されない RNA およびタンパク質をコードする。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0103

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0103】

アミノ酸の好適な保存的置換は当業者に公知であり、一般に生じる分子の生物活性、例えば酵素活性を変化させずに行うことができる。当業者ならば、一般にポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換は生物活性を実質的に変化させないことを認識している(例えば、Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224参照)。また、SP、特に一本鎖プロテアーゼ部分の触媒活性断片も本定義内に含まれる。保存的アミノ酸置換は例えば下記表1で示されるものに従って行う。

【表1】

表 1

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

他の置換も可能であり、経験的に、あるいは既知の保存的置換に従って判断することができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0135】

本明細書においてペプチドミメティックとは、生物活性型の特定のポリペプチドのコンホメーションおよび特定の立体化学的特徴を模倣する化合物である。一般にペプチドミメティクスは化合物のある望ましい特性を模すが、生物活性のあるコンホメーションの欠如や結合の崩壊を招くフレキシビリティなどの望ましくない特性は模さないように設計する。ペプチドミメティクスは生物活性化合物から、望ましくない特性に寄与する特定の基または結合を生物学的等価体に置き換えることにより作製することができる。生物学的等価体は当業者に公知のものである。例えばエンケフェリン類似体ではメチレンバイオアイソスター-CH₂Sがアミド置換体として用いられている(例えば、Spatola (1983) pp. 267-357 in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York参照)。経口投与可能なモルヒネはエンドルフィンペプチドのペプチドミメティックである化合物である。本明細書の目的では、環状ペプチドもペプチドミメティクスに含まれる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0141

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0141】

当業者ならば安定なハイブリッドのために洗浄工程を選択することは周知であり、SSPEの成分も分かっている(例えば、Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), vol. 3, p. B.13、また汎用される実験溶液を記載している多くのカタログも参照)。SSPEはpH7.4リン酸緩衝0.18M NaClである。さらに当業者ならばハイブリッドの安定性はナトリウムイオン濃度と温度の関数である T_m ($T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/l$)によって判定され、従ってハイブリッドの安定性に重要な洗浄工程における唯一のパラメーターがSSPE(またはSSC)のナトリウムイオン濃度と温度であることが分かっている。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0150

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0150】

本明細書において試験物質(または試験化合物)とは、本明細書で提供されるアッセイなどのin vitro法によって判定されるような、SP、特にプロテアーゼドメインまたは活性に関して十分なその一部を含む一本鎖型への作用が試験される化学的に定義された化合物(例えば、有機分子、無機分子、有機/無機分子、タンパク質、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、多糖類、糖類、または糖タンパク質などのようなこれらの分子のハイブリッド)または化合物の混合物(例えば、試験化合物ライブラリー、天然抽出物または培養上清など)をさす。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

本明細書において治療薬、治療計画、放射線保護剤、または化学治療薬とは、ワクチンをはじめ当業者に公知の従来の薬物および薬物療法を意味する。放射線治療薬は当技術分野で周知のものである。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0180

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0180】

プロテアーゼドメイン

プロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分を一本鎖型のSPとして含む単離された実質的に純粋なプロテアーゼが提供される。これらのプロテアーゼドメインはより長いタンパク質に含まれていてもよく、このような長いタンパク質は所望によりCVSP14チモージェンであってもよい。本発明では一本鎖としてCVSP14のプロテアーゼドメインを含む単離された実質的に純粋な一本鎖ポリペプチドが提供される。本明細書で提供されるCVSP14は腫瘍細胞によって、または腫瘍細胞内で典型的には同種の非腫瘍細胞によってそれが発現されるレベルとは異なるレベルで発現または活性化される。よって、例えば、もし前立腺または卵巣の腫瘍細胞によって発現されるSPが本明細書で卵巣癌または前立腺癌に関して着目

されるならば、それは発現、非腫瘍細胞におけるものとは異なる活性化または活性の程度を有すべきである。CVSP14は肺、大腸、前立腺、乳房、子宮、卵巣およびその他の腫瘍細胞で発現する。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0241

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0241】

組合せおよびその組合せを含むキットが所望によりアッセイの実施の説明書を添付して提供される。これらの組合せとしてはCVSP14ポリペプチドおよびアッセイするCVSP14ポリペプチドの基質、ならびに所望により基質のタンパク質分解作用を検出する試薬を含む。基質は特定のCVSP14ポリペプチドによってタンパク質分解作用を受けるタンパク質をはじめ、発色または蛍光発生分子であってもよく、CVSP14ポリペプチドの試験基質切断能を調べることで実験的に同定することができる。最も効果的に(すなわち、最低濃度、および/または最高速度、または所望の条件下で)切断される基質が同定される。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0266

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0266】

さらにチモーゲンまたは二本鎖型のCVSP14を用いてコンホメーションエピトープを認識するモノクローナル抗体を作製することもできる。次に培養上清または腹水上清から目的のモノクローナル抗体を回収する。完全な抗体と同様に免疫学的に有意な部分を含むモノクローナルまたはポリクローナル抗血清のフラグメントもアンタゴニストとして使用できる。Fab、Fab'、またはF(ab')₂フラグメントなどの免疫反応性フラグメントは、これらフラグメントが通常完全な免疫グロブリンよりも免疫原性が低いことから特に治療に関して用いられる場合が多い。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0290

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0290】

b. 既知のセリンプロテアーゼ阻害剤

スクリーニングのための化合物は、そのCVSP14活性阻害能を試験し得るセリンプロテアーゼ阻害剤であり得る。例えばスクリーニングアッセイで用いるセリンプロテアーゼ阻害剤としては、限定されるものではないが、セリンプロテアーゼ阻害剤3(SPI-3)(Chen, et al., *Cytokine*, 11:856-862 (1999));アプロチニン(Iijima, R., et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 126:912-916 (1999));Kazal型セリンプロテアーゼ阻害剤様タンパク質(Niimi, et al. *Eur. J. Biochem.*, 266:282-292 (1999));Kunitz型セリンプロテアーゼ阻害剤(Ravi Chandran, S., et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 55:1814-1821 (1999));組織因子経路阻害剤-2/マトリックス関連セリンプロテアーゼ阻害剤(TFPI-2/MSPI)、(Liu, Y. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 370:112-8 (1999));Bukunin(Cui, C.Y. et al. *J. Invest. Dermatol.* 113:182-8 (1999));メシル酸ナファモスタット(Ryo, R. et al. *Vox Sang.* 76:241-6 (1999));TPCK(Huang et al. *Oncogene* 18:3431-3439 (1999));合成綿結合セリンプロテアーゼ阻害剤(Edwards et al. *Wound Repair Regen.* 7:106-18 (1999));FUT-175(Sawada, M. et al. *Stroke* 30:644-50 (1999));セリンプロテアーゼ阻害剤FUT-0175およびトロンボキサン合成酵素阻害剤OKY-046の組合せ(Kaminogo et al. *Neur*

ol. Med. Chir. (Tokyo) 38:704-8; discussion 708-9 (1998));ラットセリンプロテアーゼ阻害因子2.1遺伝子(LeCam, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 253:311-4 (1998));グランザイムBを有するラット下垂体複合体で発現する新規の細胞内セリンプロテアーゼ阻害剤(Hill et al. FEBS Lett. 440:361-4 (1998));3,4-ジクロロイソクマリン(Hammed et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 219:132-7 (1998));LEX032(Bains et al. Eur. J. Pharmacol. 356:67-72 (1998));N-トシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン(Dryjanski et al. Biochemistry 37:14151-6 (1998));セリンプロテアーゼ阻害剤ニューロセルピンのマウス遺伝子(P112)(Berger et al. Gene, 214:25-33 (1998));ラットセリンプロテアーゼ阻害剤2.3遺伝子(Paul et al. Eur. J. Biochem. 254:538-46 (1998));Ecotin(Yang et al. J. Mol. Biol. 279:945-57 (1998));14kDaの植物関連セリンプロテアーゼ阻害剤(Roch et al. Dev. Comp. Immunol. 22(1):1-12 (1998));マトリックス関連セリンプロテアーゼ阻害剤TFPI-2/33kDa MSPI(Rao et al. Int. J. Cancer 76:749-56 (1998));ON0-3403(Hiwasaka et al., Cancer Lett. 126:221-5 (1998));ブデラスタシン(Bdellastasin)(Moser et al. Eur. J. Biochem. 253:212-20 (1998));ピクニン(Xu et al. J. Mol. Biol. 276:955-66 (1998));メシル酸ナファモスタット(Mellgren et al. Thromb. Haemost. 79:342-7 (1998));増殖ホルモン依存性セリンプロテアーゼ阻害剤Spi 2.1(Make et al. Endocrinology 138:5630-6 (1997));2型増殖因子アクチベーター阻害剤、Kunitz型セリンプロテアーゼ阻害剤(Kawaguchi et al. J. Biol. Chem., 272:27558-64 (1997));エジプトツチイナゴ(Schistocerca gregaria)の卵巣由来の熱安定型セリンプロテアーゼ阻害剤タンパク質(Hamdaoui et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:357-60 (1997));ヒト胎盤肝細胞増殖因子アクチベーター阻害剤、Kunitz型セリンプロテアーゼ阻害剤(Shimomura et al. J. Biol. Chem. 272:6370-6 (1997));FUT-187、経口セリンプロテアーゼ阻害剤(Shiozaki et al. Gan To Kagaku Ryoho, 23(14): 1971-9 (1996));細胞外マトリックス関連セリンプロテアーゼ阻害剤(Mr 33,000、31,000、および27,000)(Rao, C.N., et al., Arch. Biochem. Biophys., 335:82-92 (1996));不可逆性イソクマリンセリンプロテアーゼ阻害剤(Palencia, D.D., et al., Biol. Reprod., 55:536-42 (1996));4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニルフルオリド(AEBSF)(Nakabo et al. J. Leukoc. Biol. 60:328-36 (1996));ニューロセルピン(Osterwalder, T., et al., EMBO J. 15:2944-53 (1996));ヒトセリンプロテアーゼ阻害剤 -1-抗トリプシン(Forney et al. J. Parasitol. 82:496-502 (1996));ラットセリンプロテアーゼ阻害剤2.3(Simar-Blanchet, A.E., et al., Eur. J. Biochem., 236:638-48 (1996));メシル酸ガベキサート(parodi, F., et al., J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. 10:235-7 (1996));組換えセリンプロテアーゼ阻害剤、CPTI II(Stankiewicz, M., et al., Acta Biochim. Pol., 43(3):525-9 (1996));システイン富化セリンプロテアーゼ阻害剤(Guamerin II)(Kim, D.R., et al., J. Enzym. Inhib., 10:81-91 (1996));ジイソプロピルフルオロホスフェート(Lundqvist, H., et al., Inflamm. Res., 44(12):510-7 (1995));ネキシニン1(Yu, D.W., et al., J. Cell Sci., 108(Pt 12):3867-74 (1995));LEX032(Scalia, R., et al., Shock, 4(4):251-6 (1995));プロテアーゼネキシニンI(Houenou, L.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92(3):895-9 (1995));キマーゼ標的セリンプロテアーゼ阻害剤(Woodard S.L., et al., J. Immunol., 153(11):5016-25 (1994));N-トシル-L-リシル-クロロメチルケトン(TLCK)(Bourinbaiar, A.S., et al., Cell Immunol., 155(1):230-6 (1994));Smpi56(Ghendler, Y., et al., Exp. Parasitol., 78(2):121-31 (1994));ビルハルツ住血吸虫セリンプロテアーゼ阻害剤(Blanton, R.E., et al., Mol. Biochem. Parasitol., 63(1):1-11 (1994));Spi-1(Warren, W.C., et al., Mol. Cell Endocrinol., 98(1):27-32 (1993));TAME(Jessop, J.J., et al., Inflammation, 17(5):613-31 (1993));アンチトロンビンIII(Kalaria, R.N., et al., Am. J. Pathol., 143(3):886-93 (1993));FOY-305(Ohkoshi, M., et al., Anticancer Res., 13(4):963-6 (1993));メシル酸カモスタット(Senda, S., et al., Intern. Med., 32(4):350-4 (1993));色素上皮由来因子(Steele, F.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90(4):1526-30 (1993));アンチスタシン(Holstein, T.W., et al., FEBS Lett., 309(3):288-92 (1992));セリンプロテアーゼ阻害剤をコードする

ワクシニアウイルスK2L遺伝子(Zhou, J., et al., Virology, 189(2):678-86 (1992)); Bowman-Birkセリンプロテアーゼ阻害剤(Werner, M.H., et al., J. Mol. Biol., 225(3):873-89 (1992)); FUT-175(Yanamoto, H., et al., Neurosurgery, 30(3):358-63 (1992)); FUT-175(Yanamoto, H., et al., Neurosurgery, 30(3):351-6, discussion 356-7 (1992)); PAI-1(Yreadwell, B.V., et al., J. Orthop. Res., 9(3):309-16 (1991)); 3,4-ジクロロイソクマリン(Rusbridge, N.M., et al., FEBS Lett., 268(1):133-6 (1990)); 1-抗キモトリプシン(Lindmark, B.E., et al., Am. Rev. Respir. Dis., 141(4 Pt 1):884-8 (1990)); P-トルエンシルホニル-L-アルギニンメチルエステル(TAME)(Scuderi, P., J. Immunol., 143(1):168-73 (1989)); 1-抗キモトリプシン(Abraham, C.R., et al., Cell, 52(4):487-501 (1988)); コントラプシン(Modha, J., et al., Parasitology, 96 (Pt 1):99-109 (1988)); 2-抗プラスミン(Holmes, W.E., et al., J. Biol. Chem., 262(4):1659-64 (1987)); 3,4-ジクロロイソクマリン(Harper, J.W., et al., Biochemistry, 24(8):1831-41 (1985)); ジイソプロピルフルオロホスフェート(Tsutsui, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 123(1):271-7 (1984)); メシル酸ガベキサート(Hesse, B., et al., Pharmacol. Res. Commun., 16(7):637-45 (1984)); フェニルメチルスルホニルフルオリド(Dufer, J., et al., Scand. J. Haematol., 32(1):25-32 (1984)); プロテアーゼ阻害剤CI-2(McPhalen, C.A., et al., J. Mol. Biol., 168(2):445-7 (1983)); フェニルメチルスルホニルフルオリド(Sekar V., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 89(2):474-8 (1979)); PGE1(Feinstein, M.D., et al., Prostaglandine, 14(6):1075-93 (1977))が挙げられる。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 0 6】

2. ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクス

本明細書ではSPタンパク質と結合してその活性を調節する分子を同定するための方法を提供する。SP、特に一本鎖プロテアーゼドメインまたはその触媒活性断片と結合する分子の中にはペプチド、ポリペプチドおよび環状ペプチドを含むペプチドミメティクスが含まれる。ペプチドミメティクスとはCVSP14ポリペプチドなどの標的分子との特異的結合に必要なリガンドまたはポリペプチドの分子コンホメーションを模倣する分子または化合物である。例としての実施形態では、このペプチド、ポリペプチドまたはペプチドミメティクスは、CVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと結合する。このようなペプチドおよびペプチドミメティクスとしては、CVSP14ポリペプチドと特異的に結合する、典型的にはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと結合する抗体が挙げられる。このペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスならびに本明細書の方法によって同定されるペプチドミメティクスはCVSP14ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであり得る。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 1 3】

さらに、CVSP14ポリペプチドとの結合能を基に、このペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスを、生細胞、固定化細胞、体液、組織ホモジネート、および精製した天然生体材料でCVSP14ポリペプチドを検出する試薬として使用することができる。例えば、このようなペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスを標識することにより、CVSP14ポリペプチドを有する細胞を同定することができる。さらに、CVSP14ポリペプチド

ドとの結合能を基に、このペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスをin situ染色、FACS(蛍光活性セルソート)、ウエスタンブロット法、ELISAおよびその他の分析ブロットコールに使用できる。CVSP14ポリペプチドとの結合能を基に、このペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスをCVSP14ポリペプチドの精製、またはCVSP14ポリペプチド、例えば、CVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインをコードするポリペプチドを発現する細胞の精製に使用することができる。

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0325

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0325】

従って、例えば、改善された活性または安定性を有する、またはCVSP14ポリペプチド活性のモジュレーター(例えば、阻害剤、アゴニスト、アンタゴニスト)として働き、かつ、これらの方法、特に新生物形成疾患の診断、治療、予防およびスクリーニング法に有用である薬剤をデザインすることができる。クローン化したCVSP14ポリペプチド配列のアベラビリティのおかげで、十分量のCVSP14ポリペプチドをX線結晶学のような分析的研究を行うのに利用することができる。さらに、CVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインのアミノ酸配列の知識、例えば、配列番号13および6のヌクレオチド配列にコードされるプロテアーゼドメインから、X線結晶学の代わりに、またそれに加えてコンピューターモデリング技術に関する指針を得ることができる。

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0328

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0328】

このランダムペプチドは、例えば、ファージ粒子の表面にファージfd誘導体のpIIIまたはpVIIIのいずれかのコートタンパク質を含む融合タンパク質の一部としてか(ファージ上のペプチド)、またはプラスミドと結合したLacIペプチド融合タンパク質との融合タンパク質として(プラスミド上のペプチド)提供し得る。このペプチドをコードするDNAをはじめとするファージまたはプラスミドは、プロテアーゼドメインを有する固定化CVSP14ポリペプチドポリペプチドを用いて親和性増強プロセスによって同定および単離することができる。親和性増強プロセスは「パンニング」とも呼ばれ、典型的には固定化CVSP14ポリペプチドを有するファージ、プラスミド、またはポリソームを複数回インキュベートし、CVSP14ポリペプチドと結合するファージ、プラスミド、またはポリソームを回収し(付随するDNAまたはmRNAとともに)、さらに回収したファージまたはプラスミドを量産する(付随するLacI-ペプチド融合タンパク質とともに)ことを含む。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0351

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0351】

リンカーはCVSP14ポリペプチドのドメインおよびターゲッティングエージェントとの会合に適したいずれの部分であってもよい。このようなリンカーおよび結合には、限定されるものではないが、ペプチド結合、アミノ酸およびペプチド結合(典型的には1~約60の間のアミノ酸、より一般的には約10~30の間のアミノ酸を含む)、限定されるものではないが、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート、スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)-アミノベンゾエート、4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-

- (2-ピリジルジチオ)トルエン、スルホスクシンイミジル-6-[-メチル- -(ピリジルジチオール)-トルアミド]ヘキサノエート、N-スクシンイミジル-3-(-2-ピリジルジチオ)-プロピオネート、スクシンイミジル6[3(-(-2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド)ヘキサノエート、スルホスクシンイミジル6[3(-(-2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド)ヘキサノエート、3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオニルヒドラジド、エルマン試薬、ジクロロトリアジン酸、およびS-(2-チオピリジル)-L-システインをはじめとする、ヘテロ二官能性切断架橋リンカーなどの化学リンカーが挙げられる。その他のリンカーとしては、限定されるものではないが、CVSP14ポリペプチドのドメインとターゲティングエージェントとの間の立体障害を減らすペプチドおよびその他の部分、細胞内酵素基質、コンジュゲートの柔軟性を高めるリンカー、コンジュゲートの溶解度を高めるリンカー、コンジュゲートの血清安定性を高めるリンカー、光切断性リンカーおよび酸切断性リンカーが挙げられる。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0401

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0401】

この組成物は有効成分とともに、ラクトース、スクロース、リン酸二カルシウムまたはカルボキシメチルセルロースなどの希釈剤;ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムおよびタルクなどの滑沢剤;およびデンプン、天然ガム例えばガムアカシア、ゼラチン、グルコース、糖蜜、ポリビニルピロリジン、セルロースおよびその誘導体、ポビドン、クロスポビドンおよびその他当技術分野で公知のこの種の結合剤などの結合剤を含み得る。医薬上許容される投与可能な液体組成物は例えば、上記で定義したような有効化合物と所望の医薬アジュバントを、例えば水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、グリコール、エタノールなどの担体中に溶解、分散させる、あるいは担体中で混合することで溶液または懸濁液を形成させることにより作製できる。所望により投与する医薬組成物は湿潤剤、乳化剤または可溶化剤、pH調整剤などの微量の無毒の補助物質、例えば酢酸、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、モノラウリン酸ソルビタン、トリエタノールアミン酢酸ナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミンおよびその他のこの種の薬剤を含んでもよい。このような投与形を製造する方法は当業者には公知のものであるか、明らかである(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975参照)。投与する組成物または製剤は治療する被験体の症状の緩和に十分な量の有効化合物を含む。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0458

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0458】

ヒトCVSP14全長cDNAのクローニング

残りのCVSP14の5'上流cDNAを得るため、ジーンレーサー(GeneRacer)キット(Ambion, カタログ番号L1500-01)を用いて合成したヒト腎RACE cDNAにおいて5'-RACE反応を行った。ジーンレーサーキットはRNAリガーゼを媒介とする5'および3' cDNA末端全長迅速増幅(RLM-RACE)向けに特にデザインされたものである。最初の5'-RACE反応は遺伝子特異的プライマーGX-SP1-4AS, 5'-GTTAAGCGGCCCCAGCCTGCAGTTGTAC-3' 配列番号18とともにジーンレーサー5'プライマーを用いたPCRによって行った。このPCR産物をアガロースゲルから精製した。

【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 4 7 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 4 7 0 】

タンパク質の発現、精製および再折りたたみ

この遺伝子産物の過剰発現は、希少なコドンの至適化のためdnaYプラスミドを含む大腸菌BL21(DE3)株で行った(Garcia et. al. (1986) Cell 45:453-459; 米国特許第6,270,988号参照)。カルバニシリン(50 μ g/ml)およびカナマイシン(34 μ g/ml)を添加した2xYT培地(1L)に一晩培養したもの10mlを接種し、0.6~1.0 OD₆₀₀の密度まで増殖させた後、1M IPTG(最終濃度1mM)で誘導した。誘導増殖6時間後に細胞を遠心分離(3000g x 20分)により回収した。

【手続補正 2 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 4 7 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 4 7 9 】

上記の基質が切断されなければ、上記の対応するアッセイが使用できる。要するに結合アッセイはプラスミノーゲンおよびトリプシノーゲンなどの酵素を活性化するプロテアーゼの能力を試験する。これらのアッセイを行うには、一本鎖プロテアーゼを、プラスミノーゲンおよびトリプシノーゲンなどのチモーゲンとともに、このチモーゲンに対してはlys-プラスミノーゲンといった既知の基質の存在下でインキュベートする。その一本鎖がチモーゲンを活性化すれば、プラスミンおよびトリプシンなどの活性化酵素はその基質を分解する。