

(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2004-535166
(P2004-535166A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
A01K 67/027
A61K 31/7088
A61K 31/713
A61K 39/395

F 1

C 12 N 15/00
A O 1 K 67/027
A 61 K 31/7088
A 61 K 31/713
A 61 K 39/395

Z N A A

テーマコード(参考)

2 G 04 5
4 B 02 4
4 B 02 9
4 B 05 0
4 B 06 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 292 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-575305 (P2002-575305)
(86) (22) 出願日 平成14年3月20日 (2002.3.20)
(85) 翻訳文提出日 平成15年9月22日 (2003.9.22)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/009039
(87) 国際公開番号 WO2002/077263
(87) 国際公開日 平成14年10月3日 (2002.10.3)
(31) 優先権主張番号 60/278,166
(32) 優先日 平成13年3月22日 (2001.3.22)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 503344090
デンドレオン・サンディエゴ・リミテッド
・ライアビリティ・カンパニー
D E N D R E O N S A N D I E G O
L L C
アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア
州サンディエゴ、サイエンス・パーク・ロ
ード 3030 番
(74) 代理人 100062144
弁理士 青山 葵
(74) 代理人 100067035
弁理士 岩崎 光隆
(74) 代理人 100064610
弁理士 中嶋 正二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】セリンプロテアーゼCVSP14をコードする核酸分子、コードされるポリペプチドおよびそれに基づく方法

(57) 【要約】

本明細書では一本鎖として、または活性化二本鎖型としてプロテアーゼ活性を示すCVSP14ポリペプチドと呼ばれるポリペプチドが提供される。プロテアーゼ活性を調節する化合物を同定するためにこれらのポリペプチドを用いる方法も提供される。また、これらのポリペプチドは腫瘍マーカーとしても役立つ。

【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。

10

【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6または13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エ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エ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；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
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

40

50

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粹なポリペプチド。 10

【請求項12】

プロテアーゼドメイン部分が、配列番号15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。 20

【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。 30

【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。 40

【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】

10

20

30

40

50

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 2 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 3 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 2 5】

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 2 6】

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 2 7】

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 2 8】

(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エ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 2 4 に記載の核酸分子。

【請求項 2 9】

請求項 1 3 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 3 0】

請求項 2 4 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 3 1】

発現ベクターである、請求項 3 0 に記載のベクター。

【請求項 3 2】

真核ベクターである、請求項 3 0 に記載のベクター。

【請求項 3 3】

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 3 1 に記載のベクター。

【請求項 3 4】

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 3 0 に記載のベクター。

【請求項 3 5】

請求項 3 0 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 3 6】

原核細胞である、請求項 3 5 に記載の細胞。

【請求項 3 7】

真核細胞である、請求項 3 5 に記載の細胞。

【請求項 3 8】

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 3 5 に記載の細胞。

【請求項 3 9】

哺乳類細胞である、請求項 3 5 に記載の細胞。

【請求項 4 0】

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 4 1】

請求項 4 0 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 4 3】

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がその動物またはその原種の相同

10

20

40

50

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 4 4】

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產生する方法であって、

請求項 3 5 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 4 5】

上記ポリペプチドが培地中へ分泌される、請求項 4 4 に記載の方法。 10

【請求項 4 6】

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 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

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產生する方法であって、

請求項 4 2 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 4 8】

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 4 7 に記載の方法。 20

【請求項 4 9】

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。 30

【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)。 40

【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 50

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】

10

20

30

40

50

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66】

上記ポリペプチドがアレイを含む、請求項65に記載の支持体。

【請求項67】

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65に記載の支持体。

【請求項68】

直接またはリンカーを介して結合された請求項24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。 10

【請求項69】

上記核酸分子がアレイを含む、請求項68に記載の支持体。

【請求項70】

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68に記載の支持体。

【請求項71】

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に、加える前、または加えた後に接触させ； 20

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72】

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71に記載の方法。

【請求項73】

複数の試験物質が同時にスクリーニングされる、請求項71に記載の方法。 30

【請求項74】

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エ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71に記載の方法。 40

【請求項75】

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エ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； 50

配列番号13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71に記載の方法。

【請求項76】

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71に記載の方法。

【請求項77】

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73に記載の方法。

【請求項78】

上記ポリペプチドがアレイを含む、請求項73に記載の方法。

【請求項79】

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80】

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エ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

10

20

30

40

50

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 8 6】

上記基質が色素産生基質である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

上記基質がL-ピログルタミル-L-プロリル-L-アルギニン- ρ -ニトロアニリンヒドロクロリドである、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

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 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 9】

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 8 5 に記載の方法。

【請求項 9 0】

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 9 1】

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 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

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 9 3】

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

それ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

10

20

30

40

50

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つて、

被験体から生体サンプルを得；さらに

それを二本鎖および／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 10 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つて、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つて、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 1 0 5】

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 1 0 6】

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 1 0 7】

請求項 1 0 6 のポリペプチドをコードする核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

関連出願

2001年3月22日出願の、Edwin L. Madison and Jiunn-Chern Yehに対する「トランスマンブランセリンプロテアーゼ14をコードする核酸分子、コードされるタンパク質およびそれに基づく方法」と題された米国仮出願第60/278,166号の優先権を主張するものである。これが認められれば、主題の米国仮出願は出典明示によりその全内容を本明細書の一部とする。

【0 0 0 2】

発明の分野

プロテアーゼおよびその一部、特にプロテアーゼドメインをコードする核酸分子が提供される。また、該プロテアーゼおよびそのドメイン、ならびにコード核酸分子を用いる予後

10

20

30

40

50

、診断および治療方法も提供される。

【0003】

発明の背景およびその目的

癌は米国における第一の死因であり、3人に1人のアメリカ人で発症し、4人に1人のアメリカ人が癌で死亡する。癌は腫瘍塊を形成するまでに増殖する異常な新生細胞の数の増加、これらの新生腫瘍細胞による隣接組織の侵害、および血液またはリンパ系を介して局部リンパ節や離れた部位へ転移する悪性細胞の発生を特徴とする。

【0004】

癌の顕著な特徴として、腫瘍細胞およびそれらの環境間の連絡の破壊がある。正常細胞は刺激シグナルがなければ分裂せず、阻害シグナルが存在すると分裂を止める。組織内の細胞間では増殖刺激シグナルおよび増殖阻害シグナルが日常的に交換されている。癌化または新生物形成状態では、細胞はこれらのシグナルを「くつがえす」能力、そして正常細胞が増殖しない条件下で増殖する能力を獲得している。

【0005】

腫瘍細胞は増殖のために遺伝的変異を反映するいくつかの明瞭な異常形質を獲得している。十分研究されているある種の腫瘍のゲノムは活性化された癌遺伝子および不活性化された腫瘍抑制遺伝子をはじめ、独立に変異したいくつかの異なる遺伝子を有する。これらの遺伝的変異の各々は集合体として完全な新生物表現型を呈するいくつかの形質を付与する一役を担っているようである。

【0006】

種々の生化学因子が様々な転移相と関連づけられている。コラーゲン、ラミニンなどの糖タンパク質、およびプロテオグリカンの細胞表面レセプターは浸潤および転移における重要なステップである細胞の接着を助ける。この接着により、腫瘍細胞の組織バリアへの浸透を助ける分解酵素の放出が誘導される。ひと度腫瘍細胞が標的組織へ侵入すると、さらなる増殖には特殊な増殖因子が必要となる。腫瘍の浸潤および進行には、腫瘍細胞が一次腫瘍から離れ、それを取り巻く正常組織を破壊し、さらに血管またはリンパ管へと移動して離れた部位へ運ばれるという一連の複雑な事柄が含まれる。この正常組織のバリアの破壊は、組織の基底膜および間質成分を構成している細胞外マトリックスのタンパク質を分解する特殊な酵素の合成によってなされる。

【0007】

ある種の細胞外マトリックス分解酵素が腫瘍浸潤と関連づけられている。これにはマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)がある。例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼストロメリジンの産生が転移能を有する悪性腫瘍と関連づけられている(例えば、McDonnell et al. (1990) Smnrs. in Cancer Biology 1:107-115; McDonnell et al. (1990) Cancer and Metastasis Reviews 9:309-319参照)。

【0008】

癌細胞の転移および組織浸潤能は基底膜の分解によって助長される。MMPをはじめいくつかのプロテイナーゼ酵素は腫瘍細胞の浸潤プロセスを助長することが報告されている。MMPは基底膜の分解を促進し、それにより腫瘍細胞を組織浸潤させることが報告されている。例えば、分子量約70kDaと92kDaの2つの主要なメタロプロテイナーゼは腫瘍細胞の転移能を高めるものと思われる。

【0009】

セリンプロテアーゼ

セリンプロテアーゼ(SP)は新生物形成疾患の進行に関連づけられている。分泌型の酵素であれ細胞質貯蔵オルガネラに隔離されるものであれ、ほとんどのセリンプロテアーゼは血液凝固、創傷治癒、消化、免疫応答ならびに腫瘍浸潤および転移に役割を有する。II型トランスマンプランセリンプロテアーゼと呼ばれる、付加的な細胞外ドメインを有する膜固定タンパク質である、ある種の細胞表面タンパク質が確認されている。それらは細胞表面タンパク質として細胞内シグナル伝達および細胞表面タンパク質分解に役割を果たすものと位置づけられている。他にセリンプロテアーゼで膜結合型で、同様の機能を持つものも

10

20

30

40

50

ある。また、分泌型のものもある。多くのセリンプロテアーゼは細胞表面レセプターと結合した際にそれらの活性を發揮し、従って細胞表面で働く。細胞表面タンパク質分解は多様な細胞機能を媒介する生物活性タンパク質を生成するためのメカニズムである。

【 0 0 1 0 】

分泌型およびransmenプランセリンプロテアーゼを含むセリンプロテアーゼは新生物の発生および進行に関与するプロセスに関連づけられている。これらのプロテアーゼの正確な役割はまだ精査されていないが、セリンプロテアーゼおよびその阻害剤は腫瘍の進行に関わる癌細胞浸潤における分解作用、転移拡散、および腫瘍の血管新生をはじめとする多くの細胞内および細胞外生理学的プロセスの制御に関与している。プロテアーゼは細胞外マトリックス(ECM)の分解に関与し、組織の再構築に寄与し、癌浸潤および転移に不可欠であると考えられている。いくつかのプロテアーゼの活性および／または発現が腫瘍の進行および発達と相關していることが示されている。

10

【 0 0 1 1 】

例えば、上皮癌組織でも正常組織でも発現する(Takeuchi et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11054-61)、膜型セリンプロテアーゼMTSP1(マトリプターゼとも呼ばれる；米国特許第5,972,616号配列番号1および2；およびGenBank受託番号AF118224；(1999) J. Biol. Chem. 274:18231-18236；米国特許第5,792,616号参照、またTakeuchi (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:11054-1161も参照)が同定されている。マトリプターゼは最初にヒト乳癌細胞でマトリックスメタノプロテアーゼ(MMP)の一種の主要ゼラチナーゼとして同定されたものである(米国特許第5,482,848号参照)。これは乳癌の転移に役割を果たすことが示唆されている。マトリプターゼはまた、種々の上皮組織において高いレベルの活性で発現し、ヒト胃腸管および前立腺でも発現する。MTSP3、MTSP4、MTSP6と呼ばれるMTSPは国際PCT出願PCT/US01/03471に基づく公開国際PCT出願WO 01/57194に記載されている。

20

【 0 0 1 2 】

前立腺特異的抗原(PSA)であるカリクレイン様セリンプロテアーゼは細胞外マトリックス糖タンパク質フィブロネクチンおよびラミニンを分解し、前立腺癌細胞による浸潤を助長すると仮定されている(Webber et al. (1995) Clin. Cancer Res. 1:1089-94)。PSAのタンパク質分解活性をPSA特異的モノクローナル抗体で遮断すると、in vitroにおける高レベルのPSAを分泌するLNCaPヒト前立腺癌細胞による再構成基底膜マトリゲル(Matrigel)の浸潤に用量依存的な低下が起こる。

30

【 0 0 1 3 】

肝癌細胞で確認されている細胞表面セリンプロテアーゼであるヘプシンは卵巣癌で過剰発現する(Tanimoto et al. (1997) Cancer Res., 57):2884-7)。このヘプシン転写物は癌腫組織に豊富に見られ、正常な卵巣をはじめ正常な成体組織ではほとんど発現しない。ヘプシンは卵巣腫瘍で過剰発現することが多いので卵巣腫瘍細胞の浸潤プロセスおよび増殖能における候補プロテアーゼとなり得ることが示唆されている。

40

【 0 0 1 4 】

正常上皮細胞特異的1(NES1)と呼ばれるセリンプロテアーゼ様遺伝子(Liu et al., Cancer Res., 56:3371-9 (1996))が確認されている。全ての正常および不死化非腫瘍性上皮細胞系統でNES1 mRNAの発現が見られるが、大部分のヒト乳癌細胞系統はその発現の著しい低下または完全な欠如を示す。NES1と、増殖因子活性を調節することが知られているポリペプチドとの構造類似性およびNES1発現と乳癌発生の負の相関は、腫瘍形成の抑制におけるこのプロテアーゼ様遺伝子産物の直接的または間接的役割を示唆するものである。

【 0 0 1 5 】

よって、ransmenプランおよびその他のセリンプロテアーゼならびにその他のプロテアーゼは腫瘍の病因および病原に関与するものと思われる。これらのプロセスにおけるそれらの役割をさらに解明し、さらなるransmenプランプロテアーゼを同定する必要がある。従って本明細書の目的は、セリンプロテアーゼタンパク質ならびに腫瘍形成および／または発癌の調節または関与に関わる、かかるプロテアーゼをコードする核酸を提供す

50

ることにある。本明細書の目的はまた、かかるプロテアーゼおよびかかるプロテアーゼをコードする核酸を用いる予後、診断、治療的スクリーニングを提供することである。

【0016】

発明の概要

本明細書ではそのプロテアーゼドメインを含むCVSP14と呼ばれるタンパク質が提供される(例えば、配列番号5、6、12および13参照)。CVSP14は分泌型セリンプロテアーゼである。CVSP14はアンドロゲン依存性前立腺腫瘍で発現が高く、その他の腫瘍でも発現する。よって、これはプロテアーゼとして腫瘍の進行に関与している可能性がある。その機能的活性により、これは治療標的または診断標的とすることができます。発現および/または発現したタンパク質またはそのチモーゲン型の活性化(または発現もしくは活性化レベルの低下)は癌および癌治療のモニタリングに使用することができる。例えば、このタンパク質の発現は前立腺癌および前立腺癌治療のモニタリングに使用することができる。

10

【0017】

セリンプロテアーゼファミリーには、腫瘍細胞において非腫瘍細胞とは異なったレベルで活性化および/または発現されるメンバー、およびその基質が腫瘍細胞と非腫瘍細胞では異なるか、あるいはまたはセリンプロテアーゼ(SP)の特異性または活性を変化させる細胞に由来するものが含まれる。本明細書で提供されるセリンプロテアーゼはCVSP14と呼ばれる分泌型プロテアーゼである。このプロテアーゼドメイン、ならびにチモーゲンおよび活性型をはじめとする全長タンパク質、およびそれらの使用も提供される。スプライス変異体によってコードされるタンパク質も提供される。また、これらのタンパク質およびプロテアーゼドメインをコードする核酸分子も提供される。CVSP14のプロテアーゼドメインは配列番号6で示され、全長タンパク質配列は配列番号13で示される。コード核酸分子の配列はそれぞれ配列番号5および12で示される。

20

【0018】

CVSP14は分泌型タンパク質として発現し、細胞表面レセプターに結合し、それとの結合、あるいは二量体形成または膜結合もしくはレセプター結合タンパク質との多量体形成によるなどして細胞表面結合プロテアーゼとして働く可能性がある。

30

【0019】

また本明細書では、SPタンパク質をコードする核酸分子およびコードされるタンパク質も提供される。特にそのスプライス変異体をはじめとする、動物に由来するCVSP14をコードする核酸分子が提供される。コードされるタンパク質もまた提供される。また、その機能的ドメインも提供される。例えば、SPプロテアーゼドメイン、その一部、およびそのミューテインは、限定されるものではないが、マウスおよびラットなどの齧歯類；ニワトリなどの鳥類；ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジなどの反芻動物；ブタなどのヒツジ(ovine, such as pigs)；およびヒトをはじめとする動物のSPに由来する、または基づくものである。

40

【0020】

本明細書で提供される方法およびアッセイで用いるプロテアーゼドメインは二本鎖活性化産物を生じる活性化によるものである必要はなく、N末端が配列 ILGGを含む場合にはむしろ一本鎖ポリペプチドである。このようなポリペプチドは活性化の結果ではなく、また二本鎖型でもないが、タンパク質分解(触媒)活性を示す。これらのプロテアーゼドメインポリペプチドはCVSP14の活性を調節する薬剤をスクリーニングするアッセイで用いられる。

40

【0021】

このようなアッセイも本明細書で提供される。例としてのアッセイでは、CVSP14の全長、または一本鎖、二本鎖活性型の全長の少なくとも約70%、80%もしくは90%にわたるもの、あるいは一本鎖または二本鎖活性型であり得るプロテアーゼドメインが既知の基質、典型的には蛍光、発色あるいはその他の検出可能な標識を施した基質をタンパク質分解切断する能力に対する試験化合物の作用を評価する。タンパク質(その一本鎖もしくは二本鎖いずれかの形態の全長またはプロテアーゼドメイン)の活性を調節する薬剤、一般には化合物、特に小分子はCVSP14の活性を調節する候補化合物となる。プロテアーゼドメインおよ

50

び全長タンパク質はまた二本鎖および一本鎖プロテアーゼ特異的抗体を産生させるのに用いることができる。本明細書で提供されるプロテアーゼドメインとしては、限定されるものではないが、例えば腫瘍細胞では非腫瘍細胞とは異なるレベルで発現または活性化される、ヒトを含む哺乳類に由来するものなど、CVSP14をはじめとするいづれかのファミリーメンバーの、C末端からチモーゲンの活性化のための切断部位のN末端を有する一本鎖領域、またはin vitroタンパク質分解アッセイで一本鎖ポリペプチドとしてのタンパク質分解活性を示すそのC末端切断された一部が挙げられる。

【0022】

CVSP14の一本鎖プロテアーゼドメインのミューテイン、特にフリーの(すなわちプロテアーゼドメインの他のいづれのCysともジスルフィド結合を形成していない)プロテアーゼドメインのCys残基(配列番号6の26番の残基)が別のアミノ酸置換され、通常は着目する活性をなくさない置換がなされているミューテイン、およびグリコシリ化部位がなくされているミューテインも提供される。触媒活性が保持されるその他の置換がなされるミューテインも考えられる(アミノ酸置換の例としては例えは表1を参照)。

【0023】

よって、本発明ではCVSP14と呼ばれるセリンプロテアーゼファミリーのメンバーおよび機能的ドメイン、特にそのプロテアーゼ(または触媒)ドメイン、そのミューテインおよびその他の誘導体ならびに類似体が提供される。本明細書ではまた、CVSP14をコードする核酸が提供される。

【0024】

CVSP14の核酸およびアミノ酸配列は配列番号5および6で示される。一本鎖プロテアーゼドメインもしくはその触媒活性部分をコードする核酸分子、また全長CVSP14をコードするもの(配列番号12および13)も提供される。單一アミノ酸変異も考えられ、例えはGlyの代わりにArgが存在するペプチドが提供される。一本鎖プロテアーゼドメインもしくはその触媒活性部分をコードする核酸分子、また全長CVSP14をコードするものが提供される。また、このようなCVSP14コード核酸とそれらの全長または全長の少なくとも約70%、80%または90%にわたってハイブリダイズし、かつ、全長、またはシグナル配列またはプロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分を持たないなど、その末端切断された一部をコードする核酸分子も提供される。ハイブリダイゼーションは典型的には少なくとも低、一般には少なくとも中、多くの場合では高ストリンジエンシー条件下で行われる。

【0025】

本明細書ではさらに、CVSP14と特異的に結合してその活性を阻害する抗体が提供される。その一本鎖および/または二本鎖型を含め、タンパク質またはプロテアーゼドメインと特異的に結合する抗体が含まれる。抗体としては二本鎖特異的抗体、一本鎖特異的抗体および中和抗体がある。本明細書ではまた、CVSP14、特に一本鎖プロテアーゼドメイン、チモーゲンおよび活性型と特異的に結合する抗体も提供される。二本鎖および/または一本鎖型のCVSP14と特異的に結合する抗体が提供される。このような抗体としては、二本鎖もしくは一本鎖型のプロテアーゼドメインおよび/または全長タンパク質と特異的に結合するものが挙げられる。

【0026】

本明細書ではさらに、CVSP14およびCVSP14をコードする核酸を用いる予後、診断、治療的スクリーニング法が提供される。また、CVSPをコードする不活性化遺伝子を有し、また、非天然または天然プロモーターの制御下でCVSP14をコードする遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物も提供される。このような動物は腫瘍の発生、増殖および/または進行の動物モデルにおいて有用である。

【0027】

本明細書では肺癌、前立腺癌、大腸癌および乳癌などの特定の腫瘍または癌細胞で発現するセリンプロテアーゼ(SP)ファミリーのメンバーが提供される。特に本明細書では、CVSP14が肺癌、白血病および子宮頸癌、ならびにある種の正常な細胞および組織でも発現することが示される(例えは、組織特異的発現プロフィールに関する実施例参照)。CVSP14は

10

20

30

40

50

また乳癌、前立腺癌および大腸癌のマークーともなり得る。

【0028】

SPは腫瘍細胞では正常細胞とは異なるレベルで発現および/または活性化されると考えられ、またはその基質または補因子の変更などで腫瘍細胞と正常細胞とが異なる機能的活性を有することから注目される。また、CVSP14は腫瘍細胞で発現する、または活性があることからも注目される。よって、本明細書で提供されるCVSP14はある種の腫瘍の診断マークーとして働き得る。活性化されたCVSP14のレベルは前立腺癌、子宮癌、肺癌または大腸癌、あるいは白血病その他の癌の診断指標となり得る。

【0029】

本明細書ではまた、CVSP14活性を調節する方法、およびCVSP14活性の阻害、拮抗、促進あるいはまた変更をはじめとする調節を行う化合物をスクリーニングする方法が提供される。タンパク質の触媒部分を含むCVSP14のプロテアーゼドメインが特に注目される。

【0030】

本明細書では、限定されるものではないが、そのスプライス変異体、およびCVSPをコードする核酸、ならびにそのドメイン、誘導体および類似体をはじめとするCVSP14ポリペプチドが提供される。また、チモーゲン型のCVSP14の活性化により生じるN末端を含む一本鎖プロテアーゼドメインも提供される。このプロテアーゼドメインの切断部位は52番のアミノ酸(R-IGGS)である(配列番号12および13参照)。

【0031】

また、本明細書で提供される核酸分子のいずれかを含むプラスミドも提供される。これらのプラスミドを含む細胞も提供される。このような細胞としては、限定されるものではないが、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞が挙げられる。CVSP14ポリペプチドをコードする核酸を含む細胞およびプラスミドの他、コードされるポリペプチドの発現方法も提供される。プロテアーゼドメインの発現を達成するには、シグナル配列をコードする核酸を除去する。このタンパク質は封入体で発現させる。次にこのCVSP14プロテアーゼドメインを封入体から単離し、適切な再折りたたみが起こる条件下で処理する。よって、活性のあるCVSP14プロテアーゼドメインを产生する方法も提供される。

【0032】

また、上記細胞を、その細胞によりCVSP14が発現される条件下で増殖させ、発現したCVSP14ポリペプチドを回収することによる、CVSP14の产生方法も提供される。その他のCVSP14をコードする核酸を単離する方法も提供される。

【0033】

また、CVSP14ポリペプチドがそれら細胞により発現される、細胞、一般には哺乳類細胞および酵母細胞などの真核細胞も提供される。分泌したタンパク質が結合し得るこのような細胞はCVSP14ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定するための薬剤スクリーニングアッセイに用いられる。これらのアッセイにはin vitro結合アッセイ、およびCVSP14またはその切断産物によって直接、または増殖因子前駆体の活性化を介するなど、間接的に媒介されるシグナル伝達を評価する転写に基づくアッセイが含まれる。

【0034】

本明細書ではさらに、CVSP14およびCVSP14をコードする核酸を用いる予後、診断および治療的スクリーニング法が提供される。特にこれらの予後、診断および治療的スクリーニング法は肺癌、大腸腺癌および卵巣癌などの腫瘍または癌の予防または治療、あるいは予防または治療に有用な薬剤の発見に用いられる。

【0035】

CVSP14活性を調節する化合物のスクリーニング方法も提供される。これらの化合物はそれらをCVSP14またはそのプロテアーゼドメインおよびCVSP14の基質と接触させることにより同定される。それら化合物の不在下に比べて化合物の存在下で切断された基質の量に変化があれば、その化合物がCVSP14活性を調節することを示す。このような化合物をさらなる分析のため、または組成物またはアゴニストなど、CVSP14の活性の調節を目的とした使用

10

20

30

40

50

のために選択する。また、これらの化合物は、これらの基質とCVSP14またはその触媒活性部分と結合する細胞を接触させることによって同定することもできる。

【0036】

本明細書ではまた、CVSP14活性のモジュレーター、特に本明細書で提供されるスクリーニング方法に従って得られるモジュレーターも提供される。このようなモジュレーターは癌状態およびその他の新生物形成状態を治療する上で用途を持ち得る。

【0037】

本明細書では、医薬上許容される担体または賦形剤中にCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインおよび/または全長もしくはその他のドメインを含有する医薬組成物が提供される。

10

【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に用いる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。

【0039】

本明細書では、a)一本鎖型のCVSP14ポリペプチドまたはプロテアーゼドメイン、およびb)CVSPに直接、またはリンカーを介して連結されたターゲッティングエージェント(なお、このエージェントは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、または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助けるものである)を含有するコンジュゲートが提供される。このコンジュゲートはさらに複数のエージェントを連結して含むこともできる。コンジュゲートは化学的コンジュゲートであってもよいし、融合タンパク質であってもよい。

20

【0040】

もう1つの実施形態では、ターゲッティングエージェントはタンパク質またはペプチド断片である。このタンパク質またはペプチド断片はタンパク質結合配列、核酸結合配列、脂質結合配列、多糖結合配列、または金属結合配列を含み得る。

【0041】

被験体において異常なCVSP14レベルを検出することを特徴とする疾病または疾患の診断方法も提供される。この方法はCVSP14のDNA、RNA、タンパク質または機能的活性のレベルを測定することによって行うことができる。疾病または疾患のない類似のサンプル(または他の適当な対照)で見られるDNA、RNA、タンパク質または機能的活性のレベルに対してCVSPのDNA、RNA、タンパク質または機能的活性のレベルが上昇または低下していれば、被験体またはその他関連のいずれか適当な対照に疾病または疾患が存在することを示す。

30

【0042】

本明細書では組合せも提供される。この組合せはa)CVSP14活性の阻害剤と、b)抗癌治療または抗癌剤を含み得る。CVSP阻害剤および抗癌剤は単一の医薬組成物として調剤してもよいし、あるいは各々個別の医薬組成物として調剤してもよい。CVSP14阻害剤としては、プロテアーゼドメインと特異的に結合する抗体など、CVSP14に対して作製された抗体またはそのフラグメントもしくは結合部分、CVSP14産生阻害剤、またはCVSP14膜局在化阻害剤またはCVSP14活性化阻害剤であり得る。他のCVSP14阻害剤としては、限定されるものではないが、アンチセンス核酸またはRNAiなど、CVSP14またはその一部、特にプロテアーゼドメインの部分をコードする二本鎖RNA(dsRNA)、/異種配列がコードされるCVSP14の生物活性を不活性化するように挿入された異種ヌクレオチド配列とともにCVSP14をコードする遺伝子の少なくとも一部をコードする核酸、またはそれをコードする遺伝子が挙げられる。CVSP14をコードする遺伝子部分は典型的には異種配列に隣接していて、CVSP14をコードするゲノム遺伝子との相同組換えを促進する。

40

【0043】

また、有効量のCVSP14阻害剤を哺乳類に投与し、それにより腫瘍または癌が治療または予

50

防される、哺乳類の腫瘍または癌の治療または予防方法も提供される。治療または予防に用いるCVSP14阻害剤を医薬上許容される担体または賦形剤とともに投与する。治療する哺乳類はヒトであってもよい。この治療または予防方法はCVSP14阻害剤の投与と同時、投与後または投与前に抗癌治療または薬剤の投与をさらに含み得る。

【0044】

また、CVSP14の内在性遺伝子が動物またはその原種の相同組換えまたはその他の組換え現象、あるいは挿入突然変異誘発によって欠失または不活性化された組換え非ヒト動物も提供される。本明細書では、CVSP14の遺伝子がその遺伝子の天然プロモーターではないか、あるいはその非ヒト動物における遺伝子の天然プロモーターではないプロモーターの制御下にある場合、あるいはCVSP14をコードする核酸が非ヒト動物に対して異種であり、かつ、そのプロモーターが天然または非天然プロモーターであってもよいか、またはCVSP14がプラスミドもしくは人工染色体などの染色体外エレメント上にある場合の組換え非ヒト動物が提供される。本明細書ではさらに、CVSP14をコードする遺伝子を有し、かつ、特に非天然プロモーターの制御下か、またはプラスミドもしくは人工染色体などの外的エレメント上にCVSP14をコードする不活性化遺伝子を有するトランスジェニック非ヒト動物が提供される。

【0045】

また、腫瘍細胞で発現する、または活性となるCVSP14、特に腫瘍細胞におけるその機能的活性が非腫瘍細胞におけるよりも高いCVSP14によって活性化されるプロドラッグを投与することによる腫瘍を治療する方法も提供される。このプロドラッグを投与するのであるが、投与すると活性のあるCVSP14がプロドラッグを切断し、腫瘍細胞の近傍で有効剤が放出される。この有効な抗癌薬は腫瘍近傍に集積する。これはCVSP14が他の細胞に比べて腫瘍細胞で多量に、あるいは高いレベルで、あるいは優先的に発現する、または活性となる場合に特に有用である。

【0046】

また、一本鎖もしくは二本鎖型のCVSP14ポリペプチド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；さらにそれ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CVSP14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)上記タンパク質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

ことによる方法も提供される。これらの形態は全長であっても末端切断型であってもよく、限定されるものではないが、RI活性化部位での切断、またはプロテアーゼドメインもしくはその触媒活性部分の発現から生じたプロテアーゼドメインが含まれる。

【0047】

また、被験者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；それを二本鎖または一本鎖型のCVSP14と結合する検出可能な薬剤に曝すことにより、上記病態が二本鎖または一本鎖型の有無によって特徴付けられる方法も提供される。

【0048】

チモーゲン型のCVSP14の活性化または活性型の活性を阻害する薬剤を投与することによる、腫瘍の浸潤もしくは転移を阻害する、または悪性もしくは前悪性症状を治療する方法も提供される。これらの症状としては、限定されるものではないが、乳房、子宮頸部、前立腺、肺、卵巣または大腸の腫瘍などの症状が挙げられる。

【0049】

また、腫瘍の進行および／または治療効果をモニタリングする方法も提供される。CVSP14またはそのプロテアーゼドメインの活性化または発現レベルを評価し、そのレベルの変化が腫瘍の進行および／または治療効果を反映する。一般に腫瘍の進行とともに身体組織または体液サンプル中のCVSP14の量が増え、有効な治療法はこのレベルを引き下げる。

10

20

30

40

50

【0050】

発明の詳細な記載

A. 定義

特に断りのない限り、本明細書で用いる全ての技術および科学用語は本発明が属する分野の業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書の開示中に挙げられている全ての特許、特許出願、公開出願および公報、Genbank配列、ウェブサイトおよびその他の資料は特に断りのない限り、出典明示によりその全内容を組み入れる。本明細書の用語に複数の定義がある場合には、本節を重視する。URLまたはその他この種の識別名もしくはアドレスが参照されている場合、この種の識別名は変更可能であり、インターネット上の特定の情報は変更があってもよいが、インターネットを検索することで同等の情報が見つけられると解釈する。これらに対する参照はそのような情報の有効性および一般流布を明示するものである。

10

【0051】

本明細書において保護基、アミノ酸およびその他の化合物のいずれの略号も特に断りのない限り、それらの一般的な用法、認識されている略号、またはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature((1972) Biochem. 11:942-944参照)に従うものである。

【0052】

本明細書においてセリンプロテアーゼとは、タンパク質またはペプチドの加水分解にセリン残基が関与する多様なプロテアーゼファミリーをさす。このセリン残基はその触媒作用にセリン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸を含む触媒トリアッド機構の一部、またその触媒作用にセリンおよびリジンを含むヒドロキシル/-アミンまたはヒドロキシル/-アミン触媒ダイアッド機構の一部であり得る。ヒトを含む哺乳類起源のSPが特に注目される。当業者ならば一般にポリペプチドの非必須領域の単一アミノ酸置換では実質的に生物活性は変化しないことが分かるであろう(例えば、Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p.224参照)。

20

【0053】

本明細書において「トランスメンプランセリンプロテアーゼ(MTSP)」とは、本明細書に記載されるような共通の構造的特徴を有しているトランスメンプランセリンプロテアーゼファミリーをさす(Hooper et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:857-860も参照)。従って、例えば「MTSP」であれば、限定されるものではないが、MTSP3、MTSP4、MTSP6、MTSP7、または他のいずれかの供給源から得られる、あるいは合成によって作製された、あるいは同じ活性を示す同等の分子をはじめとする、MTSP遺伝子ファミリーによってコードされるあらゆるタンパク質が含まれる。その他のMTSPとしては、限定されるものではないが、コリン、エンテロペプチダーゼ(enterpeptidase)、ヒト気道トリプシン様プロテアーゼ(HAT)、MTSP1、TMPRSS2、およびTMPRSS4が挙げられる。例としてのMTSPおよび/またはそのドメインのコード核酸分子の配列およびコードされるアミノ酸配列は例えば米国出願第09/776,191号(その中の配列番号1~12、49、50および61~72、国際PCT出願W0 01/57194として公開)に示されている。この用語はまた各メンバーの活性を実質的に変化させないアミノ酸置換を有するMTSPを包含し、また、そのスプライス変異体も包含する。必須ではないが保存的アミノ酸置換をはじめとする好適な置換は当業者に公知であり、結果として生じる分子の触媒活性などの生物活性をなくすことなく行うことができる。

30

【0054】

本明細書において「CVSPのプロテアーゼドメイン」とは、タンパク質分解活性を示し、かつ、キモトリプシン/トリプシンファミリープロテアーゼドメインと相同性および構造的特徴を共有するCVSPのドメインをさす。従ってそれは少なくとも標準的な *in vitro* アッセイによって評価されるタンパク質分解活性を示すドメインの最小部分である。当業者ならばこのようなプロテアーゼドメインが折りたたまれたトリプシンまたはキモトリプシンと構造上同等なプロテアーゼ部分であることが分かるであろう。本明細書ではこのようなプロテアーゼドメインおよびその触媒活性部分も意図される。また、一本鎖型として触媒的に作用するその最小断片を含む末端切斷型のプロテアーゼドメインも提供される。

40

50

【0055】

本明細書においてCVSPの触媒活性ドメインとは、そのプロテアーゼドメインをさす。CVSPのプロテアーゼドメインという場合には、このタンパク質の一本鎖型に対する言及も含む。二本鎖型または両形態を意図する場合には、その旨明示する。チモーゲン型の各タンパク質は一本鎖であり、これは活性化切断によって活性のある二本鎖型へと変換される。

【0056】

本明細書においてCVSP14のプロテアーゼドメインとは、本明細書で言及される場合には常に、

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ポリペプチド；

配列番号5で示されるヌクレオチド配列と低、中または高ストリンジエ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ポリペプチド； 10

配列番号6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で示されるアミノ酸配列と少なくとも約60%、70%、80%、90%または約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／またはCVSP14のスプライス変異体のプロテアーゼドメインの少なくとも1つもしくは全て、またはいずれかの組合せ、またはその触媒活性部分を含む。

【0057】

CVSP14は動物、特に哺乳類由来のものであってよく、限定されるものではないが、ヒト、齧歯類、鳥類、反芻動物およびその他の動物が挙げられる。その全長チモーゲンまたは二本鎖活性型、あるいは二本鎖活性型または一本鎖型であり得る、プロテアーゼドメインをはじめとするそのいずれかのドメインも考えられる。 20

【0058】

活性型とは *in vivo* および／または *in vitro* で活性のある形態を意味する。本明細書においてプロテアーゼドメインはまた二本鎖型としても存在し得る。本明細書では、少なくとも *in vitro* で一本鎖型の SP およびその触媒ドメインまたはタンパク質分解活性部分(典型的には C 末端切断型)がプロテアーゼ活性を示すことが示される。よって本発明では、単離された一本鎖型の SP プロテアーゼドメインおよびその活性を調節する薬剤の同定のための *in vitro* 薬剤スクリーニングアッセイにおけるそれらの使用が提供される。 30

【0059】

本明細書において活性化切断とは、そのプロテアーゼドメインの N 末端でのプロテアーゼの切断をさす(配列番号12および13参照、この場合、R₅₅とI₅₆の間)。プロテアーゼドメインの外側の Cys(この場合 C₃₇)とプロテアーゼドメイン内の Cys(この場合 Cys₁₆₆)の間の Cys-Cys 対合により、切断時に生じるポリペプチドは二本鎖を有する(「A」鎖とプロテアーゼドメインである「B」鎖)。切断は別のプロテアーゼまたは自己触媒によって達成することもできる。

【0060】

本明細書において二本鎖型のプロテアーゼドメインとは、この場合プロテアーゼドメインと残りのポリペプチド、すなわち「A」鎖を連結する Cys₃₇ と Cys₁₆₆ の間で Cys 対合している二本鎖型のプロテアーゼからなる二本鎖型をさす。二本鎖プロテアーゼドメイン型とは、「残りのポリペプチド」、すなわち「A」鎖が短縮されるいずれの形態のものもさし、少なくとも Cys₃₇ までを含む。 40

【0061】

本明細書においてCVSP14とは、本明細書で言及される場合には常に、

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ポリペプチド；

配列番号12で示されるヌクレオチド配列と低、中または高ストリンジエ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ポリペプチド；

配列番号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60%、70%、80%、90%または約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／または

10

20

30

40

50

CVSP14のスプライス変異体

の少なくとも1つもしくは全て、またはそのいずれかの組合せを含む。

【0062】

このCVSP14ポリペプチドは配列番号13で示されるアミノ酸配列を含む。プロテアーゼ活性を保持するそのより短い部分も考えられる。そのプロテアーゼドメインは配列番号6で示される。CVSPのプロテアーゼドメインは表面ループにおける挿入および欠失をはじめ、大きさおよび構成が異なっている。それらは、活性部位トリアッド、主要特異性ポケット、オキシアニオンホールおよび/またはプロテアーゼのセリンプロテアーゼドメインのその他の特徴の少なくとも1つを含む保存構造を保持する。よって、本明細書の目的のためにには、このプロテアーゼドメインは本明細書で定義されたCVSPの一部であり、他のCVSPのドメインと相同なものである。折りたたまれたキモトリプシン(S1)の酵素のより大きなクラスのように(例えば、インターネットでアクセスできるMEROPSデータベース参照)、CVSPプロテアーゼドメインは高度のアミノ酸配列同一性を有している。活性に必要なHis、AspおよびSer残基は保存されたモチーフに存在する。その切断がプロテアーゼドメインのN末端を二本鎖型で作り出す活性化部位は保存されたモチーフを有し、容易に確認できる。

10

【0063】

目的のCVSPとしては、腫瘍細胞において非腫瘍細胞とは異なるレベルで、典型的にはより高いレベルで活性化および/または発現されるもの、および腫瘍細胞と非腫瘍細胞では基質が異なる、あるいは基質、補因子またはレセプターに関して異なる、あるいはまたCVSPの活性または特異性が変化している細胞に由来するものが挙げられる。

20

【0064】

本明細書においてヒトタンパク質とは、それらが他の哺乳類で見られる変異体ではない限り、対立遺伝子変異体および保存変異体をはじめとする、ヒトゲノムに存在するDNAなどの核酸によってコードされるものである。

【0065】

本明細書において「SPのプロテアーゼドメインまたは触媒活性部分をコードする核酸」とは、挙げられた一本鎖プロテアーゼドメインまたはその活性部分のみをコードし、他のSPの連続部分を連続配列としてコードしない核酸をさすものと解釈すべきである。

30

【0066】

本明細書において触媒活性とは、セリンプロテアーゼとしてのSPの活性をさす。SPの機能とは腫瘍の発生、増殖または進行の促進またはそれらへの関与をはじめとする腫瘍生物学におけるその機能、およびシグナル伝達における役割もさす。触媒活性とは選択された基質のタンパク質分解作用を検出する *in vitro*タンパク質分解アッセイで評価されるよう、プロテアーゼとしてのSPの活性をさす。

【0067】

本明細書においてチモーゲンとは、タンパク質分解酵素の不活性な前駆体である。このような前駆体は活性型よりも必ずしも大きくはないが、一般に大きい。セリンプロテアーゼに関して、チモーゲンは触媒および自己触媒切断、または活性のある成熟酵素を生じる活性化補因子の結合をはじめ、特異的な切断によって活性のある酵素に変換される。従ってチモーゲンはアクチベーターの作用によってタンパク質分解酵素へと変換される酵素的に不活性なタンパク質である。

40

【0068】

本明細書において「疾患または疾患」とは、例えば感染または遺伝子欠陥によって起こり、同定可能な症状を特徴とする生物の病態をさす。

【0069】

本明細書において新生物(新生物形成)とは、異常な新生増殖をさし、従って良性であれ悪性であれ、腫瘍と同じものを意味する。過形成とは異なり、新生物増殖は最初の刺激が亡くなっても持続する。

【0070】

本明細書において新生物形成疾患とは、腫瘍の発達、増殖、転移および進行を含む癌に關

50

するいづれかの疾患をさす。

【0071】

本明細書において癌とは、いづれかの種の悪性腫瘍によって引き起こされる疾患の一般用語をさす。

【0072】

本明細書において腫瘍に対して用いる悪性とは、増殖制御および位置制御の欠如を伴う転移能を有する一次腫瘍をさす。

【0073】

本明細書において抗癌剤(「抗腫瘍または抗新生物剤」と互換的に用いられる)とは、抗癌治療で用いるいづれかの薬剤をさす。これらには単独で用いる、または他の化合物と併用する、新生物形成疾患、腫瘍および癌に関連する臨床徵候または診断マーカーを緩和、軽減、改善、予防または緩解状態にする、もしくは緩解状態で維持し得るいづれの薬剤も含み、本明細書で提供される方法、組合せおよび組成物で用いることができる。限定されるものではないが、抗新生物剤の例としては抗血管形成剤、アルキル化剤、代謝拮抗物質、ある種の天然産物、白金配位錯体、アントラセンジオン類、代替尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ある種のホルモン、アンタゴニストおよび抗癌性多糖類が挙げられる。

【0074】

本明細書においてスプライス変異体とは、1を超える種のmRNAが生じるDNAなどのゲノム核酸の一次転写物の異なるプロセシングによって作り出された変異体をさす。本明細書ではSPのスプライス変異体が提供される。

【0075】

本明細書において血管形成とは、限定されるものではないが、腫瘍に伴う血管新生をはじめ、新しい血管の確立および維持(血管新生)に直接または間接的に関与するプロセス全体を広く含むものとする。

【0076】

本明細書において抗血管形成治療または抗血管形成剤とは、単独で用いる、または他の治療もしくは化合物と併用する、望ましくない、かつ/または制御できない血管形成に関連する臨床徵候または診断マーカーを緩和、軽減、改善、予防または緩解状態にする、もしくは緩解状態で維持し得るいづれの治療法および化合物もさす。よって、本明細書の目的では、抗血管形成剤は血管の確立または維持を阻害する薬剤をさす。このような薬剤としては、限定されるものではないが、抗腫瘍剤、および糖尿病性網膜症、再狭窄、過増殖性疾患その他のような望ましくない血管形成を伴う他の疾患を治療するための薬剤が挙げられる。

【0077】

本明細書において非抗血管原性抗腫瘍剤とは、主として血管形成を阻害することによって働くのではない抗腫瘍剤をさす。

【0078】

本明細書においてプロ血管形成剤とはプロ血管原性剤とは、血管の確立または維持を促進する薬剤である。このような薬剤としては、心臓発作および卒中をはじめとする心血管疾患を治療するための薬剤が挙げられる。

【0079】

本明細書において望ましくない、かつ/または制御できない血管形成とは、血管形成刺激剤の影響が血管形成阻害剤の影響より大きい病的血管形成をさす。本明細書において不全型血管形成とは、正常な血管形成に欠陥があって異常な血管形成を生じたり、血管形成がなされなかつたり、血管形成が実質的に低下したりするような疾患に関連した病的血管形成をさす。

【0080】

本明細書においてSPタンパク質のプロテアーゼドメインとは、タンパク質分解活性を示すSPのプロテアーゼドメインをさす。よって、それは標準的なin vitroアッセイによって評

10

20

30

40

50

価した場合にタンパク質分解活性を示すタンパク質の少なくとも最小部分である。本明細書ではそれは一本鎖型および二本鎖活性型もさす(二本鎖型を意図する場合はその旨記載するものとする)。プロテアーゼドメインの例としては配列番号6で示されるアミノ酸配列(配列番号5のヌクレオチドによってコードされる)の、プロテアーゼ活性を示すに少なくとも十分な部分が挙げられる。

【0081】

また、*in vitro*タンパク質分解アッセイにおいてタンパク質分解活性を有し、かつ、CVSP 14ポリペプチドの全長プロテアーゼドメインと少なくとも60%、70%、80%、90%または約95%の配列同一性を有するポリペプチドをコードするか、または特に中、通常は高ストリンジエンシー条件下で、プロテアーゼドメインをコードする核酸とその全長にわたって、またはその全長の少なくとも約70%、80%または90%にわたってハイブリダイズする核酸分子も考えられる。

【0082】

これらのプロテアーゼドメインに関しては、N末端残基が活性にとって重要であり得る。本明細書ではCVSP14プロテアーゼの一本鎖型プロテアーゼドメインは触媒活性があることが示される。このプロテアーゼドメインは一般に活性のためにそのN末端アミノ酸を必要とするので、C末端は切断することができる。除去可能な量はそのポリペプチドを、触媒的切断を評価する*in vitro*アッセイでプロテアーゼ活性に関して調べることで実験的に判定することができる。

【0083】

よって、プロテアーゼ活性を保持するそのプロテアーゼドメイン、特に一本鎖ドメインのさらに短い部分も考えられる。このようなより短い形態は一般にこのプロテアーゼドメインのC末端切斷型である。これらのプロテアーゼドメインは表面ループにおける挿入および欠失をはじめ、大きさおよび組成が異なっている。このようなドメインは活性部位トリアッド、主要特異性ポケット、オキシアニオンホールおよび/またはプロテアーゼのセリンプロテアーゼドメインのその他の特徴など、少なくとも1つの構造的特徴を含む保存構造を示す。このように本明細書の目的では、このプロテアーゼドメインは本明細書に定義されたようにCVSP14の一本鎖部分であるが、キモトリプシンまたはトリプシンのプロテアーゼドメインと類似または相同な構造的特徴および配列の保持という点で相同である。このポリペプチドは一本鎖としてタンパク質分解活性を示す。

【0084】

本明細書において相同(homologous)とは、約25%より大きい、例えば25%、40%、60%、70%、80%、90%または95%などの核酸配列同一性を意味する。必要に応じて相同性%を明示する。「相同性」および「同一性」は互換的に用いられる場合が多い。一般に配列は最大の一致が得られるようにアライメントする(例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Dvereck, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073参照)。配列同一性により、標準的なアライメントアルゴリズムプログラムで保存されているアミノ酸の数を求め、各提供者が確立したデフォルトギャップペナルティーとともに用いる。実質的に相同な核酸分子は典型的には中ストリンジエンシーまたは高ストリンジエンシーにて核酸の全長にわたって、あるいは着目する全長核酸分子の少なくとも約70%、80%または90%にわたってハイブリダイズする。また、ハイブリダイズする核酸分子のコドンの代わりに縮重コドンを含む核酸分子も考えられる。

【0085】

任意の2つの核酸分子が少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%「同一」であるヌクレオチド配列を有するかどうかは、例えばPearson et al. (1988) Proc. Na

10

20

30

40

50

tl. Acad. Sci. USA 85:2444におけるようなデフォルトパラメーターを用いる「FAST A」プログラムなどの公知のコンピューターアルゴリズムを用いて判定することができる(他のプログラムとしてはGCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073が挙げられる)。例えば、同一性の判定にはNational Center for Biotechnology Information databaseのBLAST関数が使用できる。その他商業的または公的に利用できるプログラムとしては、DNAStar "MegAlign"プログラム(Madison, WI)およびthe University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) "Gap"プログラム(Madison WI))がある。タンパク質および/または核酸分子の相同性または同一性%は例えばGAPコンピュータープログラム(例えば、Smith and Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2:482)によって改訂されたNeedleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48:443)を用いて配列情報を比較することで求めることができる。要するにこのGAPプログラムでは、類似性をアライニングされた記号(すなわちヌクレオチドまたは核酸)の同じものの数を2配列の短い方の記号の総数で割ったものと定義する。GAPプログラムのデフォルトパラメーターとしては、(1)単項比較マトリックス(同一である場合には1、同一でない場合には0の値を含む)およびSchwartz and Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)に記載のGribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:6745のウエイト比較マトリックス、(2)各ギャップに対しペナルティー-3.0、各ギャップにおける各記号にさらにペナルティー-0.10、および(3)末端ギャップにはペナルティーなしの条件を含み得る。よって本明細書において「同一性」とは、試験ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの間の比較を表す。

【0086】

本明細書において少なくとも「90%同一」とは、参照ポリペプチドに対して90~99.99までの同一性%をさす。90%を超えるレベルの同一性とは、例にとれば100アミノ酸長の試験および参照ポリヌクレオチドが比較されるということを示している。試験ポリペプチド中のせいぜい10%(すなわち100のうち10)のアミノ酸が参照ポリペプチドとは異なる。類似性の比較は試験および参照ポリヌクレオチドの間で行うこともできる。このような違いはアミノ酸配列の全長にわたってランダムに分布した点突然変異として現れる場合もあるし、最大許容値、例えば10/100アミノ酸の差(約90%の同一性)までの様々な長さの1を超える位置にクラスターをなしている場合もある。このような違いは核酸またはアミノ酸置換または欠失として定義される。約85~90%を超える相同性または同一性レベルでは、結果はプログラムおよびギャップパラメーターセットには依存しないものとなるはずであり、このような高いレベルの同一性は多くの場合ソフトウェアにたよるまでもなく容易に評価することができる。

【0087】

本明細書においてプライマーとは、プライマー伸張産物の合成が開始され得る、2以上、典型的には3を超えるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドをさす。合成を行い得る実験条件としては、ヌクレオシド三リン酸、ならびにDNAポリメラーゼなどの重合および伸張のための作用因子、好適なバッファー、温度およびpHの存在が挙げられる。

【0088】

本明細書において動物とは、限定されるものではないが、ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジ、齧歯類、ブタおよびヒトなどのいずれかの動物である。非ヒト動物とは意図する動物としてヒトを除くものである。本明細書で提供されるSPは動物、植物、原核生物および真菌類などいずれの起源をとするものであってもよい。ほとんどのCVSP14は哺乳類起源など動物起源のものである。

【0089】

本明細書において遺伝子療法とはこのような治療を求める疾患または症状を有する哺乳類

10

20

30

40

50

、特にヒトの特定の細胞、すなわち標的細胞に異種核酸(DNAなど)を導入することを含む。DNAなどの核酸は、異種核酸(DNAなど)が発現し、それによってコードされている治療産物が産生されるように、選択された標的細胞へ導入する。あるいはまた、この異種核酸(DNAなど)は何らかの方法で、治療産物をコードするDNAの発現を媒介することができ、あるいはこれは何らかの方法で治療産物の発現を直接または間接的に媒介するペプチドまたはRNAなどの産物をコードすることもできる。遺伝子療法はまた、欠陥遺伝子を代替するまたはそれが導入されている哺乳類または細胞によって産生される遺伝子産物を補足する遺伝子産物をコードする核酸を送達するために使用することもできる。導入された核酸は、哺乳類宿主では本来産生されない、あるいは治療上有効な量または治療上有用な時点で産生されないその増殖因子阻害剤などの治療化合物、またはそのレセプターなどのその腫瘍壊死因子もしくは阻害剤をコードすることができる。治療産物をコードする異種核酸(DNAなど)は、その産生またはその発現を増強する、あるいはまた変化させるために罹患宿主の細胞へ導入する前に改変することができる。遺伝子療法はまた、遺伝子発現の阻害剤またはレプレッサーまたはその他のモジュレーター送達も含み得る。

10

20

30

【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核酸(DNAがRNAをコードする場合)およびタンパク質である。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。

30

【0091】

よって本明細書では、異種核酸または外来核酸はゲノム中で見られるDNAなどの対応する核酸分子のような正確な配向または位置で存在しない核酸分子を含む。それはまた別の生物または種に由来する(すなわち、外的)核酸分子もさす。

40

【0092】

本明細書において治療上有効な産物とは、核酸を宿主に導入した際に遺伝性または後天性疾患の徵候、発現を緩和または排除する、あるいはその疾患を治癒する産物が発現する異種核酸、典型的にはDNAによってコードされる産物である。

【0093】

本明細書においてポリペプチドが本質的にプロテアーゼドメインからなると言う場合、ポリペプチドのSP部分だけがプロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分であることを意味する。このペプチドは所望により、また通常は付加的な非SP由来アミノ酸配列を含む。

【0094】

本明細書において癌または腫瘍治療または薬剤とは、単独で用いる、または他の治療もしくは化合物と併用する場合に、不全型血管形成に関連する臨床徵候または診断マーカーを緩和、軽減、改善、予防または緩解状態にする、もしくは緩解状態で維持し得るいずれの治療法および/または化合物もさす。

【0095】

本明細書においてドメインとは、その分子の他の部分とは構造上および/または機能上異

50

なる分子部分、例えばタンパク質またはコード核酸をさす。

【0096】

本明細書においてプロテアーゼとは、タンパク質またはペプチドの加水分解を触媒する酵素をさす。これにはそのチモーゲン型および活性型も含まれる。明瞭にするため、プロテアーゼという場合には全ての形態をさし、特定の形態の場合は明示する。本明細書の目的では、このプロテアーゼドメインはSPタンパク質の一本鎖および二本鎖型のプロテアーゼドメインを含む。CVSP14についても、プロテアーゼドメインは二本鎖型のプロテアーゼドメインを含む。

【0097】

本明細書において核酸とは、DNA、RNA、ならびにタンパク質核酸(PNA)およびその混合物をはじめとするその類似体を含む。核酸は一本鎖または二本鎖であり得る。プローブまたはプライマーについては所望により蛍光または放射性標識などの検出可能標識で標識した一本鎖分子が考えられる。このような分子はライブラリーのプロービングまたはプライミングのためには、典型的にはそれらの標的が統計学的に独特なものであるか、または低コピー数(典型的には5未満、一般には3未満)となるような長さのものである。一般にプローブまたはプライマーは着目する遺伝子と相補的または同一の少なくとも14、16または30個の連続する配列を含む。プローブおよびプライマーは10、20、30、50、100またはそれ以上の核酸長であってもよい。

【0098】

本明細書においてSPの断片または一部をコードする核酸とは、示されたSPの断片または一部だけをコードし、SPの他の連続する部分はコードしない核酸をさす。

【0099】

本明細書において、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位ならびにその他のシグナル配列などの調節およびエフェクターヌクレオチド配列に対する異種核酸の作動可能な連結とは、DNAなどかかる核酸とかかるヌクレオチド配列の間の関係をさす。例えばプロモーターに対する異種DNAの作動可能な連結とは、そのDNAとそのプロモーターとの間の、かかるDNAの転写がリーディングフレーム内のDNAを特異的に認識し、結合して転写するRNAポリメラーゼによってそのプロモーターから開始されるような物理的関係をさす。従って作動可能な連結または作動的結合とは、DNAなどの核酸と、プロモーター、エンハンサー、転写および翻訳停止部位ならびにその他のシグナル配列などの調節およびエフェクターヌクレオチド配列との機能的関係をさす。例えば、プロモーターに対するDNAの作動可能な連結とは、そのDNAとプロモーターの間の、かかるDNAの転写がそのDNAを特異的に認識し、結合して転写するRNAポリメラーゼによってそのプロモーターから開始されるような物理的および機能的関係をさす。発現および/またはin vitro転写を最適化するには、クローンの5'非翻訳部分を除去、付加または変化させて、不適切となり得る余分な折りたたみを除去する。あるいは、共通リボソーム結合部位(例えば、Kozak J. Biol. Chem. 266:19867-19870 (1991)参照)を開始コドンのすぐ5'側に挿入し、発現を増強することができる。このような改変の妥当性は(または必要性)は経験的決定することができる。

【0100】

本明細書においてアンチセンスオリゴヌクレオチドに関して少なくともRNAの一部に相補的な配列とは、そのRNAは一般には中または高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズして安定な二重らせんを形成し得るに十分な相補性を有する配列を意味し、従って、二本鎖SPアンチセンス核酸の場合には二重らせんDNA(またはdsRNA)の片方の鎖を試験するか、あるいは三重らせんの形成をアッセイすることができる。ハイブリダイズ能はアンチセンス核酸の相補性の程度および長さによって異なる。一般に、ハイブリダイズする核酸が長いほどそれが含み得るSPコードRNAとミスマッチする塩基が多くなるが、なお、安定した二重らせん(または場合によっては三重らせん)を形成する。当業者ならばミスマッチの許容度をハイブリダイズした複合体の融点を求める標準的な手法を用いることで確認する

10

20

30

40

50

ことができる。

【0101】

本明細書の目的では、生じるタンパク質がプロテアーゼ活性を示す限り、SPおよびそのプロテアーゼドメインのいずれでアミノ酸置換を行ってもよい。ミューテイン (mutein) は保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換を行うことで作出することができる。例えば、タンパク質の特性に望ましい変化をもたらすアミノ酸置換を行うことができる。ある実施形態では、ポリペプチドの分解を妨げる突然変異を作出することができる。多くのプロテアーゼはRおよびKなどの塩基性残基の後で切断するが、このような切断をなくすために、この塩基性残基を非塩基性残基に置き換える。阻害剤とプロテアーゼの相互作用部位で非保存的変化を生じさせることで、触媒活性を保持しつつプロテアーゼと阻害剤の相互作用を遮断することができる。触媒活性を変化させずにレセプター結合を変化させることができる。

10

【0102】

考えられるアミノ酸置換としては、表1に示されるものなどの保存的置換が挙げられ、これらはタンパク質分解活性をなくさない。本明細書に記載されるように、切断部位およびその他のこの種の部位の除去など、タンパク質の特性を変化させる置換も考えられるが、このような置換は一般に非保存的であり、当業者ならば容易に行うことができる。

【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。

20

【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
Ornithine	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

30

40

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。

【0104】

本明細書において、Abuは2-アミノ酪酸であり、Ornはオルニチンである。

【0105】

50

本明細書においてアミノ酸は、本明細書で見られる種々のアミノ酸配列で存在するが、周知の三文字または一文字略号に従って識別される。ヌクレオチドは種々のDNA断片で存在するが、当技術分野で通常用いられている標準的な一文字表記で表される。

【0106】

本明細書において、本明細書で開示されるヌクレオチド配列に基づくプローブまたはプライマーは配列番号5の少なくとも10、14、典型的には16個の連続するヌクレオチド配列を含み、プローブは配列番号5の少なくとも30、50または100個の連続するヌクレオチド配列を含む。特異的ハイブリダイゼーション用のプローブまたはプライマーの長さは着目するゲノムの複雑性の関数となる。

【0107】

本明細書において特定の医薬組成物の投与による特定の疾患の徴候の改善とは、恒久的なものであれ一時的なものであれ、持続的なものであれ一過性のものであれ、組成物の投与に帰すことができる、または組成物の投与に関連する何らかの軽減をさす。

【0108】

本明細書においてアンチセンスポリヌクレオチドとは、mRNAまたは二本鎖DNAのセンス鎖に相補的な合成ヌクレオチド塩基配列をさす。適当な条件下でセンスおよびアンチセンスポリヌクレオチドを混合すると、その2分子は結合またはハイブリダイズする。これらのポリヌクレオチドがmRNAと結合(ハイブリダイズ)すると、タンパク質合成(翻訳)の阻害が起こる。これらのポリヌクレオチドが二本鎖DNAと結合すると、RNA合成(転写)の阻害が起こる。このようにして起こる翻訳および/または転写の阻害はセンス鎖によってコードされるタンパク質の合成の阻害をもたらす。アンチセンス核酸分子は典型的には標的核酸と特異的に結合するに十分な数のヌクレオチド、一般に少なくとも5個の連続するヌクレオチド、多くの場合では少なくとも14または16または30個の連続するヌクレオチドまたは着目する遺伝子をコードする核酸分子のコード部分、例えばSPの一本鎖プロテアーゼドメインをコードする核酸に相補的な改変ヌクレオチドを含む。

【0109】

本明細書においてアレイとは、3以上のメンバーを含む抗体などのエレメントの集合体である。アドレサブルアレイとは、アレイのメンバーが典型的には固相支持体上の位置によって識別できるものである。よって、一般にアレイのメンバーは固相表面の個別に識別できる位置に固定される。

【0110】

本明細書において抗体とは、天然のものであれ、部分的もしくは完全に合成により製造されたものであれ、免疫グロブリンをさし、その抗体の特異的結合能を保持するその誘導体も含む。よって、抗体には免疫グロブリン結合ドメインに相同または実質的に相同な結合ドメインを有するいずれのタンパク質もが含まれる。抗体にはIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEをはじめとするクレームの免疫グロブリンのメンバーが含まれる。

【0111】

本明細書において抗体フラグメントとは、全長抗体の特異的結合能の少なくとも一部を保持する全長に満たない抗体のいずれかの誘導体をさす。抗体フラグメントの例としては、限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab)₂、一本鎖Fvs (scFV)、FV、dsFVジアボディーおよびFdフラグメントが挙げられる。フラグメントはジスルフィド結合によるなどして連結された複数の鎖を含む得る。抗体フラグメントは一般に少なくとも約50のアミノ酸、典型的には少なくとも200のアミノ酸を含む。

【0112】

本明細書においてFv抗体フラグメントは非共有結合的相互作用によって連結された1つの可変重鎖ドメイン(V_H)と1つの可変軽鎖ドメインからなる。

【0113】

本明細書においてdsFVとは、V_H-V_L対を安定化させる操作された分子内ジスルフィド結合を有するFvをさす。

【0114】

10

20

30

40

50

本明細書において $F(ab)_2$ フラグメントは、免疫グロブリンをペプシンでpH4.0～4.5にて消化することで得られる抗体フラグメントであり、組換え生産により同等のフラグメントを得ることができる。

【0115】

本明細書においてFabフラグメントは、免疫グロブリンをパパインで消化することで得られる抗体フラグメントであり、組換え生産により同等のフラグメントを得ることができる。

【0116】

本明細書においてscFVsとはいずれの順序であってもよいがポリペプチドリンカーによって共有結合された可変軽鎖(V_L)と可変重鎖(V_H)を含む抗体フラグメントをさす。このリンカーは2つの可変ドメインが実質的に干渉することなく架橋されるような長さのものである。含まれるリンカーとしては溶解度を高めるためにいくつかのGluまたはLys残基が全体に分散した(Gly-Ser)_n基がある。

10

【0117】

本明細書においてヒト化抗体とは、ヒトへの投与が免疫応答を引き起こさないようにヒトアミノ酸配列を含むように改変された抗体をさす。このような抗体の作製方法は公知である。例えば、モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを、不变領域のアミノ酸組成がヒト抗体に基づく抗体を発現するよう、組換えDNA技術によって改変する。このような領域を同定するためのコンピュータープログラムが設計されている。

20

【0118】

本明細書において二重特異性抗体(diabody)は二量体scFVであり、二重特異性抗体は典型的にはscFVsよりも短いペプチドリンカーを有し、通常二量体を形成する。

【0119】

本明細書において、組換えDNA法を用いることによる組換え手段による產生とは、クローニングされたDNAによってコードされるタンパク質を発現させるための分子生物学の周知の方法の使用を意味する。

30

【0120】

本明細書において評価とは、サンプル中に存在するSPまたはそのドメインの活性の絶対値を得る、また、その活性のレベルの指數、比率、パーセンテージ、視覚その他指標となる値を得るという意味において定量および定性的判定を含むものとする。評価は直接的なものでも間接的なものであってもよく、実際に検出される化学種は、もちろん、それ自体タンパク質分解産物である必要はなく、例えばその誘導体または何らかのさらなる物質であってもよい。

40

【0121】

本明細書において生物活性とは、化合物のin vivo活性、または化合物、組成物またはその他の混合物のin vivo投与時に生じる生理学的応答をさす。よって、生物活性にはこのような化合物、組成物および混合物の治療作用および医薬活性が含まれる。生物活性はこのような活性の試験または使用のために設計されたin vitro系でも観測できる。よって、本明細書の目的では、ルシフェラーゼの生物活性は基質の酸化時に蛍光が生じるそのオキシゲナーゼ活性である。

【0122】

本明細書において機能的活性とは、全長(完全な)タンパク質に伴う1以上の活性を示すポリペプチドまたはその一部をさす。機能的活性とは、限定されるものではないが、生物活性、触媒または酵素活性、抗原性(ポリペプチドと結合する、または抗ポリペプチド抗体との結合に関してポリペプチドと競合する能力)、免疫原性、多量体形成能、ポリペプチドのレセプターまたはリガンドと特異的に結合する能力が挙げられる。

【0123】

本明細書においてコンジュゲートとは、CVSP14、特にその一本鎖プロテアーゼドメインおよび1以上のターゲッティングエージェントをはじめ、1以上のSPを含む本明細書で提供される化合物をさす。これらのコンジュゲートとしては、組換え手段により融合タンパク質

50

として産生されるもの、例えばメルカプト基とのカップリングのような化学カップリングによるなど、化学的手段によって産生されるもの、および少なくとも1つのSPまたはそのドメインが直接またはリンカーを介して間接的にターゲッティングエージェントに連結されるその他のいずれかの方法によって産生されるものが挙げられる。

【0124】

本明細書においてターゲッティングエージェントとは、そのコンジュゲートと、コンジュゲートまたはそのSP部分をインターナライズし得る細胞表面レセプターとの特異的結合を提供するタンパク質またはその有効部分のような任意の一部分である。ターゲッティングエージェントはまた、例えばコンジュゲートのアフィニティー単離または精製、コンジュゲートの表面への結合、あるいはコンジュゲートまたはコンジュゲートを含有する複合体の検出を促進または助長するものであってもよい。10

【0125】

本明細書において抗体コンジュゲートとは、ターゲッティングエージェントが抗体であるコンジュゲートをさす。

【0126】

本明細書において、ある分子の誘導体または類似体とは、その分子に由来する部分またはその分子の改変型をさす。

【0127】

本明細書において特定の疾病を治療する化合物の有効量とは、その疾病に伴う症状を改善する、または何らかの方法で軽減するのに十分な量である。このような量は単位投与量として投与してもよいし、それが効果的なものとなる投与計画に従って投与してもよい。この量は疾病を治癒し得るものであるが、疾病的症状を改善するために投与するのが典型である。望ましい症状の改善を達するためには反復投与が必要な場合もある。20

【0128】

本明細書において2つの核酸配列についていう場合の同等とは、着目するその2つの配列が同じアミノ酸配列または同等のタンパク質をコードすることを意味する。2つのタンパク質またはペプチドに関して同等という場合には、その2つのタンパク質またはペプチドが、そのタンパク質またはペプチドの活性または機能を実質的に変化させないアミノ酸置換(限定されるものではないが、上記表1に示されるもののような保存的変異など)のみを有する実質的に同じアミノ酸配列を有することを意味する。同等が特性をさす場合、この特性は同じ程度で存在する必要はない(例えば、2つのペプチドは同種の酵素活性を異なる割合で示してもよい)が、これらの活性は実質的に同じであるのが通常である。2つのヌクレオチド配列に関していう相補的とは、その2つのヌクレオチド配列が対応するヌクレオチド間で典型的には25%未満、15%、5%または0%のミスマッチだけでハイブリダイズし得ることを意味する。必要に応じ相補性のパーセンテージは明示する。この2つの分子は高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズするように選択するのが典型的である。30

【0129】

本明細書において、タンパク質の活性または遺伝子もしくは核酸の発現を調節する薬剤はタンパク質の活性を低下または上昇あるいはまた変化させるか、何らかの方法で細胞内の核酸の発現をアップレギュレーションするか、ダウンレギュレーションするか、あるいはまた変化させる。40

【0130】

本明細書においてSPの活性阻害剤には、in vitroスクリーニングアッセイにおいて、SPの生産、翻訳後修飾、成熟または膜局在化を妨げるまたは低下させるいずれかの物質、あるいはその特に一本鎖型のタンパク質分解能を妨げるまたは低下させるいずれかの物質が含まれる。

【0131】

本明細書において新生物形成疾患を治療または予防する方法とは、腫瘍、その転移、腫瘍の血管形成またはその疾病を特徴付けるその他のパラメーターなどの症状のいずれかが軽減される、改善される、予防される、緩解状態とされるまたは緩解状態に維持されること50

を意味する。それはまた新生物形成疾患および転移の特徴が治療によって排除、軽減または予防されることも意味する。限定されるものではないが、この特徴の例としては制御できない基底膜および近傍の細胞外マトリックスの崩壊、内皮細胞の移動、分裂および新しい機能性毛細管への組織化、およびこのような機能性毛細管の持続が挙げられる。

【0132】

本明細書においてこれらコンジュゲートの医薬上許容される塩、エステルまたはその他の誘導体としては、このような誘導体化のための公知の方法を用いて当業者が容易に製造することができ、かつ、実質的な毒性作用なく動物またはヒトに投与できる化合物を形成するいすれかの塩、エステル、または誘導体を含み、これらは医薬上有効であってもプロドラッグであってもよい。

10

【0133】

本明細書においてプロドラッグとは、*in vivo*投与した際に生物学上、医薬上または治療上有効な形態の化合物へと代謝あるいは変換される化合物である。プロドラッグを製造するには、医薬上有効な化合物を、その有効化合物が代謝プロセスによって再生されるように改変する。このプロドラッグは代謝安定性または薬物の輸送の特徴を変化させるよう、副作用または毒性をマスキングするよう、薬物の香味を改良するよう、あるいは薬物のその他の特徴または特性を変化させよう設計することができる。*in vivo*における薬物動態プロセスおよび薬物代謝に関する知見によって、当業者ならば医薬上有効な化合物が分かれ、その化合物のプロドラッグを設計することができる(例えば、Nogradi (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392参照)。

20

【0134】

本明細書において、本明細書で提供されるスクリーニング方法によって同定される薬物とは、治療薬として、または治療薬の設計のためのリード化合物として用いる候補となるいすれかの化合物をさす。このような化合物は有機小分子、ペプチド、ペプチドミメティクス、アンチセンス分子またはRNAiなどのdsRNA、抗体、抗体フラグメント、組換え抗体およびその他薬物候補またはリード化合物として役立ち得る化合物をはじめとする小分子であり得る。

【0135】

本明細書においてペプチドミメティクスとは、生物活性型の特定のポリペプチドのコンホー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ー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ー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*, Weistein, 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クス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。

30

【0136】

本明細書においてプロモーター領域またはプロモーターエレメントとは、それが作動可能のように連結されているDNAまたはRNAの転写を制御するDNAまたはRNAセグメントをさす。プロモーター領域はRNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始に十分な特定の配列を含む。このプロモーター領域の部分はプロモーターと呼ばれる。また、プロモーター領域はこのRNAポリメラーゼの認識、結合および転写開始活性を調節する配列を含む。これらの配列はシス作用するものであってもよいし、トランス作用因子に応答するものであってもよい。プロモーターはその調節の性質に応じて構成型のものでも調節型のものでもよい。原核生物で用いるのに考えられるプロモーターの例としてはバクテリオファージT7およ

40

50

びT3プロモーターが挙げられる。

【0137】

本明細書においてレセプターとは、所定のリガンドに親和性を有する分子をさす。レセプターは天然に存在する分子であっても合成分子であってもよい。レセプターはまた当技術分野では抗リガンドとも呼ばれる。本明細書においてレセプターおよび抗リガンドは互換的である。レセプターはそのままの状態で用いてもよいし、他種との集合体として用いてもよい。レセプターは結合メンバーと直接または特定の結合物質もしくはリンクマーを介して間接的に共有結合または非共有結合または物理的接触によって結合し得る。レセプターの例としては、限定されるものではないが、抗体、細胞膜レセプター、表面レセプターおよびインターナライジングレセプター、特定の抗原決定基(ウイルス、細胞またはその他の物質上にあるものなど)、薬物、ポリヌクレオチド、核酸、ペプチド、補因子、レクチン、糖類、多糖類、細胞、細胞膜およびオルガネラと反応性のあるモノクローナル抗体および抗血清が挙げられる。

10

【0138】

レセプターおよびこのようなレセプターを用いる適用の例としては、限定されるものではないが以下のものが挙げられる。

a) 酵素：抗生物質[リガンド]選択の標的として役立つ、微生物の生存に必須の特定の輸送タンパク質または酵素；

b) 抗体：着目する抗原のエピトープと結びつく抗体分子上のリガンド結合部位の同定が検討でき、抗原エピトープを模倣する配列の決定が、その免疫原がこのような配列の1以上に基づくワクチンの開発、あるいは自己免疫疾患などに対する治療処置に有用な関連の診断剤または化合物の開発につながり得る；

20

c) 核酸：タンパク質またはRNAなどのリガンド結合部位の同定；

d) 触媒ポリペプチド：1以上の反応体の1以上の生成物への変換を含む化学反応を促進し得る、ポリペプチドを含む高分子；このようなポリペプチドは一般に少なくとも1つの反応体または反応中間体に特異的な結合部位およびその結合部位に近接した活性官能基を含み、なおこの官能基は結合した反応体を化学的に修飾し得る(例えば、米国特許第5,215,899号参照)；

e) ホルモンレセプター：レセプターと高い親和性で結合するリガンドの同定はホルモン置換療法の開発に有用である。例えば、このようなレセプターと結合するリガンドの同定は血圧を制御する薬物の開発につながり得る；

30

f) 脳のオピエートレセプターと結合するリガンドの同定はモルヒネおよび関連薬物の常用癖の低い代替物の開発に有用である。

30

【0139】

本明細書においてサンプルとは、アナライトイッセイが望まれるアナライトを含有し得るいずれのものもさす。サンプルは体液または生体組織などの生体サンプルでありうる。体液の例としては尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、便、痰、脳脊髄液、涙、粘液、羊水などが挙げられる。生体組織とは、結合組織、上皮組織、筋肉組織および神経組織をはじめとする、細胞の、通常はヒト、動物、植物、細菌、真菌またはウイルス構造の構造素材の1つをなすそれらの細胞内物質を伴う特定種の集合体である。生体組織の例としてはまた、臓器、腫瘍、リンパ節、動脈および個々の細胞も挙げられる。

40

【0140】

本明細書においてミスマッチのパーセンテージを判定する際のハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは以下の通りである。

1) 高ストリンジエンシー：0.1×SSPE、0.1% SDS、65

2) 中ストリンジエンシー：0.2×SSPE、0.1% SDS、50

3) 低ストリンジエンシー：1.0×SSPE、0.1% SDS、50

【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 Cl

50

oning, 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0.18NaCl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 ($T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/I$)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。

【0142】

同等のストリンジエンシーは別のバッファー、塩および温度を用いて達成できるものと理解される。限定されるものではないが例として、低ストリンジエンシー条件を用いる方法としては以下の通りである:(また、Shilo and Weinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792 (1981)も参照): DNAを含むフィルターを40 で6時間、35%ホルムアミド、5 X SSC、50mMトリス-HCl(pH7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1% Ficoll、1% BSA、および500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNA(10X SSCは1.5M塩化ナトリウム、および0.15Mクエン酸ナトリウム、pH7に調整したものである)を含有する溶液で前処理する。

【0143】

ハイブリダイゼーションは以下の改変を伴う同溶液で行う: 0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNA、10%(wt/vol)硫酸デキストラン、および5~20 $\times 10^6\text{cpm}$ ^{32}P 標識プローブを用いる。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中で40 にて18~20時間インキュベートした後、2X SSC、25mMトリス-HCl(pH7.4)、5mM EDTA、および0.1% SDSを含有する溶液中で55 にて1.5時間洗浄する。この洗浄溶液を新鮮な溶液に置き換え、60 にてさらに1.5時間インキュベートする。フィルターをプロットドライし、オートラジオグラフィーに露光する。必要であれば65~68 でフィルターの3回目の洗浄を行い、フィルムに再び露光する。使用できるその他の低ストリンジエンシー条件は当業者に公知である(例えば、種間ハイブリダイゼーションに用いられるものなど)。

【0144】

限定されるものではないが例として中ストリンジエンシーの条件を用いる方法としては以下の通りである: DNAを含むフィルターを55 で6時間、6X SSC、5Xデンハート溶液、0.5% SDSおよび100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含有する溶液中で前処理する。同溶液でハイブリダイゼーションを行い、5~20 $\times 10^6\text{cpm}$ ^{32}P 標識プローブを用いる。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中で55 にて18~20時間インキュベートした後、1X SSCおよび0.1% SDSを含有する溶液中で60 にて30分間2回洗浄する。フィルターをプロットドライし、オートラジオグラフィーに露光する。使用できるその他の中ストリンジエンシー条件は当業者に公知である。フィルターの洗浄は2X SSC、0.1% SDSを含有する溶液中で37 にて1時間行う。

【0145】

限定されるものではないが例として高ストリンジエンシー条件を用いる方法は以下の通りである: DNAを含むフィルターのプレハイブリダイゼーションを65 にて8時間~一晩、6X SSC、50mMトリス-HCl(pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAかなるバッファー中で行う。フィルターを、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAおよび5~20 $\times 10^6\text{cpm}$ の ^{32}P 標識プローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合物中で65 にて48時間ハイブリダイズさせる。フィルターの洗浄は2X SSC、0.01% PVP、0.01% Ficoll、および0.01% BSAを含有する溶液中で37 にて1時間行う。その後、オートラジオグラフィー前に0.1X SSC中で50 にて45分間の洗浄を行う。使用できるその他の高ストリンジエンシー条件は当業者に公知である。

【0146】

実質的に同一または相同または類似とは関連の技術分野の業者が理解しているように文脈によって異なり、通常には少なくとも60%または70%同じであることを意味し、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも5%同じであることを意味する。

【0147】

10

20

30

40

50

本明細書において産物に対して実質的に同一とは、着目する特性がその産物の代わりに実質的に同一の産物を使用できるに十分違いがないというような十分な類似性を意味する。

【0148】

本明細書において実質的に純粋とは、このような純度を評価するために当業者が用いる薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの標準的な分析方法によって判定されるような容易に検出できる不純物を含まないと考えられるに十分均一であること、またはさらなる精製がその物質の酵素および生物活性などの物理・化学的特性を検出できる範囲では変化させないといったように十分純粋であることを意味する。実質的に化学的に純粋な化合物を製造するための化合物の精製方法は当業者に公知である。しかしながら、実質的に化学的に純粋な化合物は立体異性体または異性体の混合物であってもよい。このような場合、さらなる精製により化合物の特異的活性が増強され得る。

【0149】

本明細書において標的細胞とは、*in vivo*でSPを発現する細胞をさす。

【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に作用す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。

【0151】

本明細書において治療薬、治療計画、放射線保護剤、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。

【0152】

本明細書において治療とは、症状、疾患または疾病的徴候を改善するあるいは有益な方向に変えるいずれかの方法を意味する。本明細書の組成物の医薬的使用も治療に含まれる。

【0153】

本明細書においてベクター(またはプラスミド)とは、発現またはその複製のいずれかの目的で異種核酸を細胞へ導入するために用いる個々のエレメントをさす。これらのベクターは典型的にはエピソームに留まるが、遺伝子またはその一部のゲノム染色体への組み込みを達成するよう設計することもできる。また、酵母人工染色体および哺乳類人工染色体などの人工染色体であるベクターも考えられる。このようなビヒクルの選択または使用は当業者に周知のものである。発現ベクターとしてはプロモーター領域などこのようなDNA断片の発現を達成し得る調節配列と作動可能なように連結されたDNAを発現させ得るベクターが挙げられる。よって発現ベクターとは、プラスミド、ファージ、組換えウイルスまたはその他のベクターなど、適当な宿主細胞へ導入された際にクローニングされたDNAの発現をもたらす組換えDNAまたはRNA構築物をさす。適当な発現ベクターは当業者に周知であり、真核細胞および/または原核細胞中で複製可能であるもの、およびエピソームに留まるもの、または宿主細胞ゲノムへ組み込まれるもののが含まれる。

【0154】

本明細書においてタンパク質結合配列とは、他のタンパク質またはペプチド配列と、一般には一連のタンパク質またはペプチド配列と、あるいは特定のタンパク質またはペプチド配列と特異的に結合し得るタンパク質またはペプチド配列をさす。

【0155】

本明細書においてエピトープタグとは、エピトープタグで標識されたタンパク質またはペプチドのその後の生化学的および免疫学的分析を助けるエピトープに相当するアミノ酸残基の短いストレッチをさす。エピトープタグ標識はエピトープタグの配列を適当な発現ベ

10

20

30

40

50

クターのタンパク質コード配列に含めることによって達成される。エピトープタグタンパク質はそれらのタグに対して作製された特異性の高い抗体を用いてアフィニティー精製することができる。

【0156】

本明細書において金属結合配列とは、金属イオン、一般には一連の金属イオンまたは特定の金属イオンと特異的に結合し得るタンパク質またはペプチド配列をさす。

【0157】

本明細書において組合せとは、2種以上のもののいずれかの会合を意味する。

【0158】

本明細書において組成物とは、いずれかの混合物をさす。それは溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性またはそのいずれの組合せであってもよい。 10

【0159】

本明細書において流体とは、流動可能ないずれかの組成物をさす。よって流体には、半固体、ペースト、溶液、水性混合物、ゲル、ローション、クリーム、およびその他この種の組成物の形態にある組成物が含まれる。

【0160】

本明細書において細胞抽出液とは、溶解または破碎した細胞からなる調製物または画分をさす。

【0161】

本明細書において薬剤は、タンパク質単独で会合しているか、あるいはその会合基質、結合相手などを伴って会合しているかに関連する特定の配列を考えずに無作為にその薬剤を選択する場合には、無作為に選択されるという。無作為に選択される薬剤の例としては、化学ライブラリーまたはペプチドコンビナトリアルライブラリー、あるいは生物の増殖液またはコンディショニング培地の使用がある。 20

【0162】

本明細書において薬剤は、標的部位の配列および/または薬剤の作用と関連したそのコンホーメーションを考慮に入れた非無作為性に基づいてその薬剤を選択する場合には、合理的に選択または設計される、という。実施例で記載するように、配列番号3または配列番号4を有するタンパク質においてはセリンプロテアーゼ結合部位および(触媒)部位が提示されている。薬剤はこれらの部位を構成するペプチド配列を用いて合理的に選択または合理的に設計することができる。例えば、合理的に選択されるペプチド剤としては、そのアミノ酸配列がATPまたはカルモジュリン結合部位もしくはドメインと同一であるペプチドが挙げられる。 30

【0163】

限定するものではなく開示を明解にするため、詳細な説明を以下のサブセクションに分ける。

【0164】

B. CVSP14ポリペプチド、そのミューテイン、誘導体および類似体

SP

セリンプロテアーゼ(SP)は哺乳類またその他の種で見られるタンパク質ファミリーである。SPは本明細書に記載されるようないくつかの一般的構造特徴を共有する。これらのタンパク質分解ドメインは保存されたモチーフに存在する触媒活性に必要な保存されたHis、AspおよびSer残基を含む配列相同性を共有する。これらのSPはチモーゲンとして合成され、特異的切断によって二本鎖型へと活性化される。 40

【0165】

SPファミリーは治療的介入の標的となり得、腫瘍発生、発達、増殖および/または進行の診断マーカーとしても役立ち得る。上述したように、このファミリーのメンバーは腫瘍発達、増殖および/または進行に関係していると思われるタンパク質分解プロセスに関与する。このような関係は細胞外マトリックスの崩壊および再構成ならびに増殖およびプロ血管形成因子の活性化におけるタンパク質分解酵素としてのそれらの作用に基づくもので 50

ある。さらに、同じ組織の腫瘍細胞と非腫瘍細胞では、それらの発現レベルまたは活性化、もしくは基質レベルまたは基質の変更およびそのレベルに起因するそれらの見掛けの活性のレベルが異なる。従って、それらの活性および/または発現を調節する化合物とそれらを接触させることなどによる、タンパク質分解活性などのそれらの活性およびシグナル伝達および/またはそれらの発現における役割を変化させるプロトコールおよび処理は腫瘍発達、増殖および/または進行に影響を与える。また、いくつかの例では、活性化および/または発現のレベルは臍臓、胃、子宮、肺、大腸、ならびに子宮頸癌などの腫瘍、また乳癌、前立腺癌または白血病に変化をもたらし得る。このようにSPは腫瘍の診断マークとして役立ち得る。

【0166】

10 その他の例では、SPタンパク質はその補因子または基質の活性または発現を変化させることで活性の変化を示し得る。血清、血液、唾液、脳脊髄液、滑液および間質液、尿、汗およびその他のこの種の体液および分泌液など、体液におけるSP、特にプロテアーゼドメインの検出は診断用腫瘍マークとして役立ち得る。特に、新生物形成疾患を持たないことが分かっている被験体に比べ、あるいは同じ被験体からの初期のサンプルと比べて被験体中に高レベルのこのようなポリペプチドが検出されることが、その被験体の新生物形成疾患の指標となり得る。

【0167】

CVSP14と呼ばれるファミリーメンバーが提供される。本明細書では、本明細書で提供されるCVSP14がある種の腫瘍で発現および/または活性化されるセリンプロテアーゼであることが示され、従ってそれらの活性化または発現が腫瘍の発達、増殖および/または進行の診断マークとして役立ち得ることが示される。このCVSP14はまた薬物標的としての使用のためにも提供され、本明細書に例示されるものをはじめ、スクリーニングアッセイで用いられる。本明細書では、一本鎖タンパク質分解ドメインがin vitroで機能することから、このファミリーのメンバーの活性を調節する薬剤を同定するin vitroアッセイで有用であることが示される。さらに二本鎖型または全長またはシグナルペプチドが除かれたその末端切断型もこのようなアッセイで使用できる。

【0168】

特定の実施形態では、CVSP14ポリペプチドは腫瘍を持たない被験体の体液におけるレベルとは異なるレベルで体液中で検出可能である。他の実施形態では、このポリペプチドは腫瘍に存在するが、そのポリペプチドの基質または補因子が同種の組織の非腫瘍細胞における発現レベルとは異なるレベルで発現する。

【0169】

CVSP14

実質的に精製したCVSP14チモーゲン、活性化二本鎖型、一本鎖プロテアーゼドメインおよび二本鎖プロテアーゼドメインが提供される。そのシグナル配列を含む全長CVSP14ポリペプチドは配列番号12および13で示される。シグナル配列は発現時または発現前に切断され得る。

【0170】

また、CVSP14と少なくとも60%、70%、80%、90%または約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む実質的に精製されたタンパク質も提供される(なお、同一性%は標準的なアルゴリズムと、同一性%を最大にするギャップペナルティーを用いて求められる)。ヒトCVSP14ポリペプチドは例示であって、その他の哺乳類CVSP14ポリペプチドも考えられる。本明細書ではCVSP14のスプライス変異体、特にタンパク質分解活性プロテアーゼドメインを伴うものも考えられる。

【0171】

その他の実施形態では、CVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分を含むが、配列番号13で示される全アミノ酸配列は含まない、実質的に精製されたポリペプチドが提供される。これらの中には配列番号6と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または100%同一の配列を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドがある。

10

20

30

40

50

【0172】

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プロテアーゼドメインと、あるいは配列番号13で示されるアミノ酸配列を含むプロテアーゼと少なくとも約60%、70%、80%、90%または約95%の配列同一性を有する、実質的に精製されたCVSP14ポリペプチド、および触媒活性ドメインおよび部分を含むその機能的ドメインが提供される。

【0173】

配列番号6に関して、プロテアーゼ活性化切断部位はR₅₅とI₅₆の間であり、相同性に基づく触媒トリアッドはH₉₆、D₁₄₆、S₂₄₄であり、N₁₀₈VTに可能性のあるN-グリコシル化部位があり、Cys対合はプロテアーゼドメインとそのポリペプチドの残りの部分を連結しているC₃₇-C₁₆₆、また、C₁₈₀-C₂₅₀、C₂₁₁-C₂₂₉およびC₂₄₀-C₂₆₉の間であると推定される。従ってこのプロテアーゼドメインにおいてはC₁₆₆はフリーなCysであり、これはまた二本鎖分子としても提供することができる。しかしながら本明細書では、一本鎖型にタンパク質分解活性があることが示される。

【0174】

また、本明細書で提供される核酸分子によってコードされるポリペプチドも提供される。これらのポリペプチドには、CVSP14プロテアーゼドメイン、または特異性とプロテアーゼ活性が失われず、かつ、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または保持されているか、あるいは実質的に変化がないようなアミノ酸変位を有するポリペプチドが含まれる。特にセリンプロテアーゼ触媒ドメインを含み、さらにその他のドメインを含み得る実質的に精製された哺乳類SPタンパク質が提供される。CVSP14はホモ二量体を形成することができ、また、膜結合タンパク質などの他のいくつかのタンパク質とヘテロ二量体を形成することもできる。

【0175】

機能的に活性のあるCVSP14のドメイン、断片、誘導体または類似体はセリンプロテアーゼ活性、免疫原性および抗原性など、CVSP14ポリペプチドに関連する1以上の機能的活性を示し得るものが提供される。

【0176】

CVSP14ポリペプチドの少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50、および典型的には10~15個のアミノ酸を含む抗原エピトープが提供される。これらの抗原エピトープは例えば抗体作製のために使用される。各エピトープまたはそれらの組合せ、および一本鎖および二本鎖型に特異的な抗体も提供される。

【0177】

CVSP14ポリペプチドのミューテインおよび誘導体

全長CVSP14、チモーゲンおよびその活性型、ならびにCVSP14プロテアーゼドメイン、その一部、ならびにこのようなポリペプチドのミューテインおよび誘導体が提供される。誘導体としては、限定されるものではないが、マウスおよびラットなどの齧歯類；ニワトリなどの鳥類；ヤギ、ウシ、シカ、ヒツジなどの反芻動物；ブタなどのヒツジ(ovine such as pigs)；およびヒトをはじめとする動物のCVSP14に基づくものがある。例えばCVSP14誘導体は置換、付加または欠失によってそれらの配列を変更することで作出することができる。CVSP14誘導体としては、限定されるものではないが、配列内の残基が機能的に同等なアミノ酸残基で置換されてサイレント変異となっている変異配列を含むCVSP14の全アミノ酸配列または部分アミノ酸配列を主要なアミノ酸配列として含むものが挙げられる。例えば、配列内の1以上のアミノ酸残基が、機能的同等物として働く類似極性の別のアミノ酸で置換してサイレント変異を生じさせることができる。配列内の1つのアミノ酸の置換はそのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば非極性(疎水性)アミノ酸としてはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。正電荷(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが挙げられる。負電荷(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙

10

20

30

40

50

げられる(例えば、表1参照)。そのアミノ酸の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%または95%までが別のアミノ酸で置換されているCVSP14、またはプロテアーゼドメインなどのそのドメインのミューテインも提供される。一般にこのようなミューテインは非変異型タンパク質のプロテアーゼ活性の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を保持する。

【0178】

1以上Cys残基、特に活性化二本鎖型では対合しているが、プロテアーゼドメイン単独では対合していない残基(すなわち、プロテアーゼドメインの26番残基のCys(配列番号5および6参照))がいずれかのアミノ酸、必ずしもそうでなくともよいが典型的にはSerなどの保存的アミノ酸残基で置換されているミューテインが考えられる。CVSP14のミューテイン、特に一本鎖プロテアーゼドメインのCysなどのCys残基が活性を消失しない別のアミノ酸で置換されているものが提供される。

10

20

30

40

【0179】

アミノ酸が別のアミノ酸に置換されているこのタンパク質のミューテインも提供される。ミューテインとしてはCys残基が必ずしもそうでなくともよいが典型的にはセリンなどの保存的アミノ酸残基で置換されているものが挙げられる。本明細書ではこのようなミューテインも提供される。アミノ酸配列の10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%またはそれ以上が置換されているが、生じるポリペプチドが同じ基質に対する非変型としての触媒活性の少なくとも約10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%または95%を保持するミューテインが提供される。

【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チモーゲンであってもよい。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、例えば本明細書で卵巣癌または前立腺癌に関して着目すると、SPが前立腺または卵巣の腫瘍細胞によって発現されるとすれば、発現、活性化または活性の程度は非腫瘍細胞におけるものとは異なる。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。

【0181】

SPプロテアーゼドメインはCVSP14の一本鎖プロテアーゼドメインを含む。いずれかのSP、特にCVSP14のプロテアーゼドメインであるSPの部分を含むプロテアーゼドメインまたはタンパク質が提供される。このタンパク質はアミノ酸のその他の非SP配列も含んでもよいが、本明細書で提供されるものなど、プロテアーゼドメインまたはこのようなプロテアーゼ活性を評価するいずれかのin vitroアッセイで触媒活性を示すに十分なその一部を含む。また、二本鎖活性型の全長プロテアーゼ、および二本鎖型のプロテアーゼドメインも提供される。

【0182】

ある実施形態では、実質的に精製されたSPプロテアーゼは、少なくとも中、一般には高ストリンジエンシーの、そのプロテアーゼドメインコード核酸がその全長にわたって、あるいは全長の少なくとも約70%、80%または90%にわたってハイブリダイズするような条件下で配列番号5で示されるヌクレオチド配列によってコードされるプロテアーゼドメインを含む核酸分子とハイブリダイズする核酸によってコードされている。他の実施形態では、実質的に精製されたSPプロテアーゼは配列番号6で示されるアミノ酸配列またはその触媒活性部分を実質的に含む一本鎖ポリペプチドである。

【0183】

特に例としてのプロテアーゼドメインは少なくとも、配列番号6で示されるアミノ酸配列(

50

配列番号5のヌクレオチドによってコードされている)の、本明細書に提供されるアッセイにおいてプロテアーゼ活性を示すに十分な部分を含む。

【0184】

シグナルペプチド(配列番号13のアミノ酸1~25)も提供される。さらにシグナルペプチドが除去された成熟CVSP15ポリペプチドも提供される。

【0185】

以下に記載するように、本明細書ではシグナル配列を有するプロポリペプチド、成熟ポリペプチドおよびその触媒活性部分、プロテアーゼドメインおよびその触媒活性部分、これらタンパク質いずれもの二本鎖および一本鎖型をはじめとするあらゆる形態のCVSP14が提供され、スクリーニングアッセイで、また、それに特異的な抗体を作製するために使用できる。腫瘍細胞および体液におけるこのタンパク質の発現、定量および/または活性化は疾病またはそれが存在しないことの診断指標となり得る。

10

【0186】

核酸分子、ベクターおよびプラスミド、細胞およびCVSP14ポリペプチドの発現

核酸分子

ヌクレオチドコード配列の縮重により、CVSP14遺伝子と実質的に同じアミノ酸配列をコードする他の核酸配列を使用することもできる。これらには限定されるものではないが、その配列内にそのアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって改変され、従ってサイレント変異を生じるCVSP14遺伝子の全部または一部を含むヌクレオチド配列が含まれる。

20

【0187】

また、CVSP14をコードする上記ヌクレオチド配列と少なくとも低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー、および/または高ストリンジェンシーでハイブリダイズし、かつ、プロテアーゼドメインおよび/またはCVSP14の全長タンパク質もしくはその他のドメインあるいはそのスプライス変異体または対立遺伝子変異体をコードする核酸分子も提供される。通常、これらの分子はこのような条件下で少なくとも1つのドメインに関してそれらの全長にわたって(または全長の少なくとも約70%、80%もしくは90%にわたって)ハイブリダイズし、プロテアーゼドメインなど、そのポリペプチドの少なくとも1つのドメインをコードする。特にこのような核酸分子としては、少なくとも1つのセリンプロテアーゼドメインをコードし、(1)プロテアーゼまたは触媒活性のあるものなどその機能的活性ドメインをコードするヌクレオチド配列を含み、かつ、(2)以下:

30

(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またはそのドメインをコードするヌクレオチド配列;

(b)このような部分または全長プロテアーゼをコードし、かつ、通常、このようなタンパク質またはその断片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)このような部分もしくは全長オープンリーディングフレームによってコードされるアミノ酸配列を含むセリンプロテアーゼまたはそのドメインをコードするヌクレオチド配列;

40

(d)このようなサブユニットをコードし、かつ、mRNA転写物に相補的なDNA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セリンプロテアーゼをコードするヌクレオチド配列;

(e)(a)~(d)のいずれか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

(f)(a)~(e)のいずれかの全長または一部の縮重コドンを含むヌクレオチド配列の中から選択される、

いずれかの単離された核酸断片を含む。

【0188】

単離された核酸断片とは、ゲノムDNAまたはcDNAを含むDNA、またはRNAであり、あるいはタンパク質核酸などのその他の成分も含み得る。単離された核酸は異種または天然プロモーター、およびその他の転写および翻訳調節配列などの付加的な成分を含んでもよく、こ

50

これらの遺伝子は、レポーター遺伝子その他の指標遺伝子、すなわち指標をコードする遺伝子など、その他の遺伝子と連結させることができる。

【0189】

本明細書で提供されるCVS14はタンパク質分解活性を示すプロテアーゼドメインをコードする配列を含み、かつ、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、典型的には中、通常は高ストリンジエンシー条件下で、通常はプロテアーゼドメインの全長にわたって、または全長の少なくとも約70%、80%または90%にわたってハイブリダイズする核酸によってコードされている。本明細書ではまたスプライス変異体も提供される。

【0190】

特定の実施形態では、CVSP14と呼ばれるCVSPをコードする核酸が提供される。特にこの核酸は配列番号5で示されるヌクレオチド配列、または触媒活性ポリペプチドをコードするその一部を含む。また、配列番号5またはその縮重物と少なくとも低ストリンジエンシー、通常には中ストリンジエンシー、より典型的には高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする核酸分子も提供される。

【0191】

ある実施形態では、単離された核酸断片は配列番号5で示されるヌクレオチド配列(またはその縮重物)を含む核酸分子と高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズし、ある実施形態では配列番号5および6で示されるヌクレオチド配列を含む。全長CVSP14は配列番号13で示され、配列番号12またはその縮重物によってコードされる。

【0192】

また、in vitroタンパク質分解アッセイにおいてタンパク質分解活性を有する一本鎖SPプロテアーゼをコードし、かつ、CVSP14ポリペプチドの全長プロテアーゼドメインと少なくとも60%、70%、80%、85%、90%または95%の配列同一性を有するか、あるいはプロテアーゼドメインをコードする核酸と、特に中、通常には高ストリンジエンシー条件下で全長にわたって、または全長の少なくとも約70%、80%または90%にわたってハイブリダイズする核酸分子も考えられる。上記のように、コードされるポリペプチドは一本鎖としてのプロテアーゼを含む。

【0193】

この単離核酸はCVSP14をコードする配列の少なくとも10ヌクレオチド、25ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、150ヌクレオチド、または200ヌクレオチドあるいはそれ以上の連続するヌクレオチド、あるいは全長SPコード配列を含み得る。別の実施形態では、この核酸は35、200または500ヌクレオチド長より短い。CVSP14をコードする核酸分子とハイブリダイズする、または相補的な核酸としては一本鎖であっても二本鎖であってもよい。例えば、CVSP14をコードする核酸、特にそのプロテアーゼドメインの少なくとも10、25、50、100または200ヌクレオチド、または全コード領域に相補的な配列(特にその逆位成分である)を含む核酸が提供される。CVSP14としては全長タンパク質またはそのドメインもしくは活性断片も提供される。

【0194】

各核酸分子について核酸はDNAであってもRNAであってもPNAまたはその他の核酸類似体であってもよく、あるいは非天然ヌクレオチド塩基を含んでもよい。SPをコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子も提供される。

【0195】

プローブ、プライマー、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびdsRNA

また、プローブまたはプライマーとして使用でき、配列番号5で示される少なくとも約10、14、16ヌクレオチド、通常は1000未満、または100以下(またはその相補物)を含むか、あるいは少なくとも約30ヌクレオチド(またはその相補物)を含むか、あるいはこのようないずれかの断片またはオリゴヌクレオチドに対して全長にわたって、または全長の少なくとも約70%、80%または90%にわたってハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むその断片またはオリゴヌクレオチドが提供される。これらの断片の長さはそれらを用いる目的および/または着目するゲノムの複雑性による。一般にプローブおよびプライマーは約50

10

20

30

40

50

0、150、100未満のヌクレオチドを含む。

【0196】

これら核酸分子に由来するプローブおよびプライマーも提供される。このようなプローブおよびプライマーはCVSP14の連続するヌクレオチドと同一な少なくとも8、14、16、30、100以上の連続するヌクレオチドを含む。これらのプローブおよびプライマーは所望により放射性標識または蛍光タグなどの検出可能な標識で標識してもよく、あるいは質量分析またはその他の手段で検出できるだけの異なる質量を有していればよい。

【0197】

また、CVSP14をコードするヌクレオチド配列またはその一部に相補的な分子の配列を含む単離された核酸分子も提供される。RNAiなどの二本鎖RNA(dsRNA)も提供される。

10

【0198】

プラスミド、ベクターおよび細胞

これらの核酸分子を含むプラスミドおよびベクターも提供される。コードされたタンパク質を発現する細胞をはじめ、これらのベクターを含む細胞も提供される。細胞は細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞または動物細胞であってもよい。本明細書では、SPまたはその一本鎖型のプロテアーゼドメインを、例えばコードされるSPが細胞によって発現されるような条件下で細胞を増殖させ、発現したタンパク質を回収することによって産生させる方法も提供される。なお、CVSP14に関しては全長チモーゲンおよび活性化タンパク質および活性化(二本鎖)プロテアーゼおよび一本鎖プロテアーゼドメインが提供される。

20

【0199】

以下に述べるように、CVSP14ポリペプチドおよびその触媒活性部分は天然シグナル配列または異種シグナルを用いて分泌タンパク質として発現させることもできる。あるいは例として挙げられているように、タンパク質は細胞質中の封入体として発現させ、それから単離することもできる。得られたタンパク質は再折りたたみすべく処理することができる(例えば実施例1参照)。本明細書では、活性型のプロテアーゼドメインが封入体で発現させ、それから単離し、変性後に再折りたたみすることで産生可能であることを示す。

【0200】

C. 腫瘍特異性および組織発現プロフィール

SPは各々特徴的な組織発現プロフィールを有し、特にSPはもっぱら腫瘍で発現または活性化されるというわけではないが、特徴的な腫瘍組織発現または活性化プロフィールを示す。SPはその基質または補因子もしくはSPの見掛けの機能的活性を変化させるその他の因子に違いがあるために腫瘍細胞では非腫瘍細胞とは異なる活性を有する場合がある。従って、新生物形成疾患を持たない被験体に比較した新生物形成疾患を有する被験体(すなわち哺乳類、特にヒト)における活性および/または発現のレベル、あるいは機能によって、各々特定の腫瘍の診断マーカーとして役立ち得る。さらに、特定の組織での活性(および/または発現)の検出は新生物形成疾患の指標となり得る。

30

【0201】

体液中の循環SPは新生物形成疾患の指標となり得る。分泌CVSP14または活性化CVSP14も新生物形成疾患の指標となる。また、各々の活性および/または発現プロフィールにより、それらはその活性のモジュレーターの投与またはSPの1つによって特異的に活性化されるプロドラッグの投与によるなど、治療標的としても役立ち得る。

40

【0202】

組織発現プロフィール

CVSP14

CVSP14はアンドロゲン依存性腫瘍細胞株において高レベルで発現する。CVSP14転写物は正常な腎サンプルでも検出されたが、対応する腎腫瘍サンプルでは全てCVSP14シグナルは消失していた。3組の前立腺の正常/腫瘍cDNAサンプルでは全て弱いシグナルが検出された。正常な乳房の9サンプル中3サンプルでも弱いシグナルが検出された。また、7つの子宮腫瘍のうち1つでも弱いシグナルが検出されたが、それらの対応する正常組織では検出さ

50

れなかった。正常な肺組織では3サンプル中2サンプルでも弱いシグナルが検出されたが、それらに対応するする腫瘍サンプルでは検出されなかつた。HeLa細胞、バーキットリンパ腫Daudi細胞、慢性骨髄性白血病K562、前骨髄細胞性白血病HL-60細胞、ミエローマG361細胞、肺癌A549細胞、リンパ芽球性白血病MOLT-4および結腸直腸腺癌SW480細胞をはじめとする種々の腫瘍細胞株からのcDNAサンプルでは極めて弱いシグナルが認められる。

【0203】

従つて前立腺癌など特定の細胞では発現が腫瘍マーカーとして働き得るが、腎臓など他の組織では発現または活性化が見られないことが腫瘍マーカーとして働く。

【0204】

D. SPタンパク質遺伝子の同定および単離

CVSP14ポリペプチドをはじめとするSPポリペプチドまたはそのドメインはタンパク質精製および組換えタンパク質発現に関する当技術分野で周知の方法によって得ることができる。目的の遺伝子をコードする核酸の同定には当業者に公知のいずれの方法を用いてもよい。SPタンパク質をコードする全長(すなわち全コード領域を包含する)cDNAまたはゲノムDNAクローニングを得るには当技術分野で利用できるいずれの方法を用いてもよい。特に、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーにおいて、腫瘍および非腫瘍細胞または組織において発現が異なる、または異なるレベルで活性化されるタンパク質をコードすることが確認される配列、例えばCVSP14ポリペプチド(配列番号5、6、12および13)をコードする核酸を増幅するにはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いることができる。適当な起源(例えば腫瘍または癌組織)に由来する核酸サンプル(RNAまたはDNA)、典型的にはcDNAライブラリーから配列をPCR増幅するためのプライマーとして、同定された配列の3'および5'末端の配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

【0205】

PCRは例えばPerkin-Elmer CetusサーマルサイクラーとTaqポリメラーゼ(Gene Amp(商標))を用いて行うことができる。増幅されるDNAとしては、真核生物由来のmRNAまたはcDNAまたはゲノムDNAのいずれもが含まれる。PCR反応に用いる場合、いくつかの異なる縮重プライマーを合成することも選択できる。既知のヌクレオチド配列と単離される核酸ホモログとの間のより高い、またはより低い程度のヌクレオチド配列類似性を考慮することで核酸ホモログを増幅するため(例えば、ヒト以外の種に由来するSPタンパク質配列を得るために、またはCVSP14ポリペプチドとの相同性を有するヒト配列を得るために)にはPCR反応の誘導に用いるハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーを変えることもできる。種間ハイブリダイゼーションでは、低または中ストリンジエンシー条件を用いる。同種ハイブリダイゼーションでは、一般に中または高ストリンジエンシー条件を用いる。同定されたSPタンパク質配列の全てまたは一部を含む核酸、またはSPタンパク質ホモログの全てまたは一部をコードする核酸が首尾よく増幅されれば、そのセグメントを分子クローニングして配列決定し、それをプローブとして用いて完全なcDNAまたはゲノムクローニングを単離することができる。次には、この遺伝子の完全ヌクレオチド配列の決定、その発現の分析、および機能分析のためのそのタンパク質産物の生産が可能となる。ヌクレオチド配列が決定されれば、オープンリーディングフレームの決定のための当技術分野で周知のいずれかの方法、例えばヌクレオチド配列解析のための公開コンピュータープログラムを用いてSPタンパク質遺伝子のタンパク質産物をコードするオープンリーディングフレームを決定することができる。オープンリーディングフレームが定義されれば、そのオープンリーディングフレームによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を決定するのが通例である。このようにして完全なSPタンパク質遺伝子のヌクレオチド配列ならびにSPタンパク質および類似体のアミノ酸配列を同定することができる。

【0206】

いずれの真核細胞であってもSPタンパク質遺伝子の分子クローニングの核酸ソースとして利用できる可能性がある。これらの核酸は脊椎動物、哺乳類、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、鳥類、ウマ、イヌ、ならびにその他の靈長類ソース、昆虫、植物などから単離できる。DNAはクローニングされたDNA(例えばDNA「ライブラリー」)から当技術分野で公知の標準的

10

20

30

40

50

な方法により、化学合成により、cDNAクローニングにより、または所望の細胞から精製したゲノムDNAもしくはその断片のクローニングにより得ることができる(例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II参照)。ゲノムDNAに由来するクローニングはコード領域の他、調節DNA領域およびイントロンDNA領域を含み得るが、cDNA由来のクローニングはエキソン配列しか含まない。遺伝子はそのソースに関わらずその遺伝子の複製に好適なベクター中へ分子クローニングしなければならない。

【0207】

ゲノムDNA由来の遺伝子の分子クローニングでは、そのある部分が目的の遺伝子をコードするDNA断片を作製する。このDNAは種々の制限酵素を用いて特定の部分で切断することができる。あるいは、マンガンの存在下でDNAアーゼを用いてDNAを断片化してもよいし、例えば音波処理によりDNAを物理的に剪断してもよい。この線状DNA断片は次に、限定されるものではないが、アガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動およびカラムクロマトグラフィーをはじめとする標準的な技術によって大きさに従って分離することができる。

【0208】

DNA断片が作製できれば、いくつかの方法で目的遺伝子を含む特定のDNA断片の同定を行うことができる。例えばSPタンパク質(いずれの種のものであってもよい)遺伝子(例えば上記のようにして得られたPCR増幅産物または既知のヌクレオチド配列の部分配列を有するオリゴヌクレオチド)またはその特定のRNAの一部、またはその断片を精製および標識し、作製したDNA断片を、標識プローブとの核酸ハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることができる(Benton and Davis, Science 196:180 (1977); Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961 (1975))。プローブと実質的相同性を有するDNA断片がハイブリダイズする。また、制限酵素消化して、利用できるならば既知の制限地図に従って予測されたものと断片サイズを比較することにより、あるいはDNA配列解析を行い、既知のSPタンパク質ヌクレオチド配列と比較することにより適当な断片を同定することもできる。遺伝子の特性をもとにさらなる選択を行うこともできる。あるいは、その発現産物の物理的、化学的または免疫学的特性に基づくアッセイにより、その遺伝子の存在を検出することもできる。例えばcDNAクローニングまたは適切なmRNAをハイブリッド選択するDNAクローニングとしては、例えば類似または同じ電気泳動での移動、等電点電気泳動挙動、タンパク質分解消化地図、抗原特性、セリンプロテアーゼ活性を有するタンパク質を生じるものを選択することができる。抗SPタンパク質抗体が利用できる場合にはELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)型の手法において標識した抗体とSPタンパク質を合成すると推定されるクローニングを結合させることによりタンパク質を同定することができる。

【0209】

CVSP14ポリペプチドゲノムDNAを単離する別法としては、限定されるものではないが、既知の配列から遺伝子配列を化学合成すること、またはcDNAからSPタンパク質をコードするmRNAを作製することが挙げられる。例えば、SPタンパク質遺伝子のcDNAクローニングのためのRNAをそのタンパク質を発現する細胞から単離することができる。次に、同定および単離された核酸を適当なクローニングベクターへ挿入することができる。当技術分野で公知の多数のベクター-宿主系を使用できる。可能性のあるベクターとしては、限定されるものではないが、プラスミドまたは改变ウイルスがあるが、このベクター系は用いる宿主細胞に適合するものでなければならない。このようなベクターとしては、限定されるものではないが、誘導体などのバクテリオファージ、またはpBR322もしくはpUCプラスミド誘導体などのプラスミドまたはBluescriptベクター(Stratagene, La Jolla, CA)が挙げられる。クローニングベクターへの挿入は例えばそのDNA断片を相補的付着端を有するクローニングベクターへ連結することで達成することができる。断片に対して相補的な制限部位を用いれば、そのDNAはクローニングベクターには存在せず、DNA分子の末端は酵素的に修飾することができる。あるいは、そのDNA末端にヌクレオチド配列(リンカー)を連結す

10

20

30

40

50

ることで所望のいずれの部位も作製できるが、これらの連結リンカーは制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする化学合成された特異的オリゴヌクレオチドを含むことができる。別法としては、切断したベクターおよびSPタンパク質遺伝子をホモポリマーテーリングにより改変することもできる。組換え分子は例えば形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションおよびソナーポレーションによって宿主細胞に導入することができ、これにより多数の遺伝子配列コピーが作出される。

【0210】

特定の実施形態では、単離されたSPタンパク質遺伝子、cDNAまたは合成DNA配列を組み込んだ組換えDNA分子で宿主細胞を形質転換することにより複数の遺伝子コピーを作出することができる。従って、形質転換体を増殖させ、その形質転換体から組換えDNA分子を単離し、必要であれば単離した組換えDNAから挿入遺伝子を回収することにより多量の遺伝子を得ることができる。

10

【0211】

E. SPタンパク質またはそのプロテアーゼドメインをコードする核酸を含むベクター、プラスミドおよび細胞、ならびにSPタンパク質の発現
ベクターおよび細胞

1以上のSPタンパク質を組換え発現させるには、SPタンパク質をコードするヌクレオチド配列の全てまたは一部を含む核酸を適当な発現ベクター、すなわち挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクターに挿入することができる。また、必要な転写および翻訳シグナルもSP遺伝子の天然プロモーターおよび/またはそれらのフランкиング領域によって提供することができる。

20

【0212】

また、SPをコードする核酸を含むベクターも提供される。それらのベクターを含む細胞も提供される。細胞としては真核および原核細胞が含まれ、ベクターは使用に好適ないずれのものであってもよい。

【0213】

ベクターを含む、内皮細胞をはじめとする原核および真核細胞が提供される。このような細胞としては細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞が挙げられる。これらの細胞は、コードされるSPタンパク質またはSPタンパク質のプロテアーゼドメインが細胞によって発現されるような条件下で上記細胞を増殖させ、発現したプロテアーゼドメインタンパク質を回収することにより、SPタンパク質またはそのプロテアーゼドメインを生産するのに用いられる。本明細書の目的では、このプロテアーゼドメインは培地中に分泌させることができる。

30

【0214】

ある実施形態では、プロテアーゼ活性を有し、SPタンパク質のプロテアーゼドメインのみの全てまたは一部、またはその複数コピーを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターが提供される。また、そのプロテアーゼドメインおよび全長SPタンパク質まで(全長を含む)のさらなるSPタンパク質の部分、ならびにその複数コピーをコードするヌクレオチド配列を含むベクターも提供される。これらのベクターは細胞中のSPタンパク質またはそのプロテアーゼドメインの発現に関して、あるいはSPタンパク質が分泌タンパク質として発現するように選択することができる。あるいは、これらのベクターはコードされたタンパク質の分泌に必要なシグナルを含むこともできる。プロテアーゼドメインが発現すると、核酸はサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)接合因子シグナル配列もしくはその一部などの分泌シグナルまたは天然シグナル配列をコードする核酸と結びつく。

40

【0215】

タンパク質コード配列を発現させるには多様な宿主-ベクター系を用いることができる。このようなものとして、限定されるものではないが、ウイルス(例えばワクシニアウイルス、アデノウイルスなど)感染哺乳類細胞系、ウイルス(例えばバキュロウイルス)感染昆虫細胞系、酵母ベクターを含む酵母などの微生物、またはバクテリオファージ、DNA、

50

ラスミドDNAまたはコスミドDNAで形質転換した細菌が挙げられる。ベクターの発現エレメントはその強度および特性において様々である。用いる宿主-ベクター系に応じて多数の好適な転写および翻訳エレメントのいずれか1つを用いることができる。

【0216】

適当な転写 / 翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列を含むキメラ遺伝子を含む発現ベクターを構築するには、DNA断片をベクター中へ挿入することを目的とした当業者に公知のいずれの方法を用いてもよい。これらの方法として *in vitro*組換えDNAおよび合成技術ならびに *in vivo*組換え(遺伝子組換え)が挙げられる。SPタンパク質、またはそのドメイン、誘導体、断片もしくはホモログをコードする核酸配列の発現は第二の核酸配列によって調節することができ、これによりこれらの遺伝子またはその断片はその組換えDNA分子で形質転換された宿主で発現する。例えばこれらタンパク質の発現は当技術分野で公知のいずれかのプロモーター / エンハンサーによって制御することができる。特定の実施形態では、このプロモーターはSPタンパク質の遺伝子にとって本来のものではない。使用できるプロモーターとしては、限定されるものではないが、SV40初期プロモーター(Bernist and Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981))、ラウス肉腫ウイルスの長い3'末端反復に含まれるプロモーター(Yamamoto et al., *Cell* 22:787-797 (1980))、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982))、-ラクタマーゼプロモーター(Villa-Kamaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731 1978)またはtacプロモーター(DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 (1983))などの原核生物発現ベクター(また、“Scientific American” 242:79-94 (1980)のUseful Proteins from Recombinant Bacteria”も参照); ノバリン合成酵素プロモーター(Herrara-Estrella et al., *Nature* 303:209-213 (1984))またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター(Garder et al., *Nucleic Acids Res.* 9:2871 (1981))および光合成酵素リブロースニリン酸カルボキシラーゼ(Herrera-Estrella et al., *Nature* 310:115-120 (1984))のプロモーターを含む植物発現ベクター; Gal4プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼプロモーター、アルカリ性ホスファターゼプロモーターなどの酵母およびその他の真菌類に由来するプロモーターエレメント; および組織特異性を示し、トランスジェニック動物において用いられている以下の動物転写制御領域: 腺房細胞で活性なエステラーゼI遺伝子制御領域(Swift et al., *Cell* 38:639-646 (1984); Ornitz et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987))、臍細胞で活性なインスリン遺伝子制御領域(Hanahan et al., *Nature* 315:115-122 (1985))、リンパ細胞で活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al., *Cell* 38:647-658 (1984); Adams et al., *Nature* 318:533-538 (1985); Alexander et al., *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987))、精巣、乳房、リンパ細胞および肥満細胞で活性なマウス乳癌ウイルス制御領域(Leder et al., *Cell* 45:485-495 (1986))、肝臓で活性なアルブミン遺伝子制御領域(Pinckert et al., *Genes and Devel.* 1:268-276 (1987))、肝臓で活性な-フェトタンパク質遺伝子制御領域(Krumlauf et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 (1985); Hammer et al., *Science* 235:53-58 1987))、肝臓で活性な-1アンチトリプシン遺伝子制御領域(Kelsey et al., *Genes and Devel.* 1:161-171 (1987))、骨髄細胞で活性なグロビン遺伝子制御領域(Mogram et al., *Nature* 315:338-340 (1985); Koliias et al., *Cell* 46:89-94 (1986))、脳の乏突起神経膠細胞で活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readhead et al., *Cell* 48:703-712 (1987))、骨格筋で活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Sani, *Nature* 314:283-286 (1985))、および視床下部の性腺刺激細胞で活性な性腺刺激ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., *Science* 234:1372-1378 (1986))が挙げられる。

【0217】

特定の実施形態では、SPタンパク質、またはそのドメイン、断片、誘導体もしくはホモログをコードする核酸と作動可能なように連結されたプロモーター、1以上の複製起点、お

10

20

30

40

50

より所望により1以上の選択マークター(例えば抗生物質耐性遺伝子)を含むベクターが用いられる。SPタンパク質のコード配列またはその一部を含む発現ベクターは例えばこれらのコード部分を3つのpGEXベクター(グルタチオンSトランスフェラーゼ発現ベクター(Smith and Johnson, Gene 7:31-40 (1988))の各々のEcoRI制限部位へサブクローニングすることにより作出される。これは適切なリーディングフレームにおける産物の発現を意図したものである。SPタンパク質のプロテアーゼドメインの発現のためのベクターおよび系としては周知のピキアベクター(例えば、Invitrogen, San Diego, CAから入手可能)、特にコードされているタンパク質が分泌するように設計されたものが挙げられる。ベクターの一例が実施例に記載されている。

【0218】

10

大腸菌(*E. coli*)細胞の形質転換のためのプラスミドとしては例えばpET発現ベクター(米国特許第4,952,496号参照、NOVAGEN, Madison, WIから入手可能;また、この系について記載したNovagenが公開している文献も参照)がある。このようなプラスミドとしてはT7lacプロモーター、T7ターミネーター、誘導性大腸菌lacオペレーターおよびlacレプレッサー遺伝子を含むpET 11a; T7プロモーター、T7ターミネーターおよび大腸菌ompT分泌シグナルを含むpET 12a-c;ならびにHisカラムによる精製で用いるHis-タグ(商標)リーダー配列およびカラム精製後に切断を可能とするトロンビン切断部位、T7-lacプロモーター領域およびT7ターミネーターを含むpET 15bおよびpET19b(NOVAGEN, Madison, WI)が挙げられる。

【0219】

20

これらベクターをピキア細胞および、大腸菌などの細菌細胞のような宿主細胞に導入し、そこでタンパク質が発現される。ピキア株は公知であって容易に入手でき、例えばGS115がある。細菌宿主はlacUVプロモーター(米国特許第4,952,496号参照)などの誘導プロモーターに作動可能なように連結されたT7 RNAポリメラーゼをコードするDNAの染色体コピーを含むことができる。このような宿主としては限定されるものではないが、溶原性大腸菌株BL21(DE3)が挙げられる。

【0220】

30

発現およびタンパク質產生

SPドメイン、誘導体および類似体は当技術分野で公知の種々の方法によって產生させることができる。例えばSPタンパク質、あるいはそのドメイン、断片または誘導体を発現する組換え細胞が同定されれば、個々の遺伝子産物を単離、分析することができる。これは限定されるものではないが産物を放射性標識した後にゲル電気泳動、免疫アッセイ、マークー標識産物との架橋により分析するなど、タンパク質の物理的および/または機能的特性に基づいたアッセイによって行う。

【0221】

40

CVSP14ポリペプチドは限定されるものではないがカラムクロマトグラフィー(例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、逆相高速クロマトグラフィー、高速タンパク質液体クロマトグラフィーなど)、示差遠心分離、示差溶解度またはタンパク質精製に用いる他のいずれかの標準的な技術をはじめとする当技術分野で公知の標準的な方法によって(複合体もしくはタンパク質を発現する天然源または組換え宿主細胞のいずれかから)単離、精製することができる。機能的特性は当技術分野で公知のいずれかの好適なアッセイを用いて評価することができる。

【0222】

あるいは、SPタンパク質またはそのドメインもしくは誘導体が同定されれば、それをコードする遺伝子のヌクレオチド配列からタンパク質のアミノ酸配列を推定することができる。結果としてタンパク質またはそのドメインもしくは誘導体は当技術分野で公知の標準的な化学法によって合成することができる(例えば、Hunkapiller et al, Nature 310:105-11 (1984)参照)。

【0223】

SPタンパク質配列の操作はタンパク質レベルで行うことができる。本明細書ではまた、例

50

えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子またはその他の細胞リガンドとの連結などによる翻訳中または翻訳後に異なる修飾を受けるSPタンパク質、そのドメイン、誘導体または類似体もしくはその断片も意図する。多数の化学修飾はいずれも、限定されるものではないが臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、ツニカマイシンの存在下での代謝合成などによる特異的化学切断をはじめとする公知の技術によって行うことができる。

【0224】

さらに、SPタンパク質のドメイン、類似体および誘導体も化学合成することができる。例えば所望のドメインを含むか、または所望の *in vitro* 活性を媒介するSPタンパク質の一部に相当するペプチドはペプチド合成装置を用いて合成することができる。さらに所望により、非従来型アミノ酸または化学的アミノ酸類似体をSPタンパク質配列へ置換または付加として導入することもできる。非従来型アミノ酸としては、限定されるものではないが、通常アミノ酸のD異性体、a-アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、-Abu、e-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシリラニン、-アラニン、フルオロ-アミノ酸、また -メチルアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、および一般にはアミノ酸類似体が挙げられる。また、アミノ酸はD型(右旋型)またはL型(左旋型)であってもよい。

10

20

30

40

50

【0225】

天然産物が突然変異を有すると推定されるか、または新しい種から単離される場合、その天然源、ならびに *in vitro* で発現したもの、または *in vivo* もしくは *in vitro* で合成された発現ベクターから単離されたSPタンパク質のアミノ酸配列はDNA配列の解析から、あるいはまた単離されたタンパク質の直接配列決定によって決定することができる。このような解析はマニュアルシーケンシングにより、または自動アミノ酸シーケネーターの使用によって行うことができる。

【0226】

特にCVSP14のプロテアーゼドメインの発現のためには、シグナル配列なしで細胞内でタンパク質を発現させることができることが有利であることが分かっており、これによりプロテアーゼドメインを含む封入体が集積または形成されることになる。これらの封入体を単離、変性、可溶化し、プロテアーゼドメインを再折りたたみし、次にこれをRI部位で切断することにより活性化させる(例えば、実施例を参照)。

【0227】

修飾

本明細書ではSPタンパク質およびドの種々の修飾を意図する。SPをコードする核酸分子は当技術分野で公知の多くの方法のいずれかによって修飾される(Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York)。これらの配列を適当な部位で制限酵素にて切断した後、所望によりさらに酵素修飾し、単離して *in vitro* で連結することができる。SPのドメイン、誘導体または類似体をコードする遺伝子の產生においては修飾した遺伝子が、所望の活性がコードされている遺伝子領域に翻訳停止シグナルによって妨げられない元の翻訳リーディングフレームを確実に保持するよう留意しなければならない。

【0228】

さらにSPをコードする核酸分子は翻訳、開始および／または終結配列を作出および／または破壊するよう、あるいはコード領域にバリエーションを作り出し、かつ／または新たな制限エンドヌクレアーゼ部位を形成または既存のものを破壊してさらなる *in vitro* 修飾を助長するよう、*in vitro* または *in vivo* で変異させることができる。また、本明細書で記載されるように、Cys残基の置換およびグリコシル化部位の除去など、一次配列の変更を伴うミューテインが考えられる。このような突然変異は、限定されるものではないが、化

学的突然変異誘発および *in vitro* 部位指定突然変異誘発 (Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253:6551-6558 (1978))、TAB(登録商標)リンカー (Pharmacia) の使用をはじめとする当技術分野で公知の突然変異誘発技術のいずれかによって達成することができる。ある実施形態では、例えば、SPタンパク質またはそのドメインを蛍光標識を含むように修飾する。他の特定の実施形態では、SPタンパク質を異種機能試薬を有するように修飾するが、このような異種機能試薬はその複合体のメンバーを架橋するために使用できる。

【0229】

SPタンパク質は限定されるものではないが、カラムクロマトグラフィー(例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、逆相高速クロマトグラフィー、高速タンパク質液体クロマトグラフィーなど)、示差遠心分離、示差溶解度またはタンパク質精製に用いる他のいずれかの標準的な技術をはじめとする当技術分野で公知の標準的な方法によって(複合体もしくはタンパク質を発現する天然源または組換え宿主細胞のいずれかから)単離、精製することができる。機能的特性は当技術分野で公知のいずれかの好適なアッセイを用いて評価することができる。

10

【0230】

F. スクリーニング方法

本明細書で示されるように、一本鎖プロテアーゼドメインはその活性を調節する化合物を同定する種々の方法で使用することができる。腫瘍細胞でより高い活性または発現を示すSPについては、タンパク質分解活性を阻害する化合物が特に注目される。腫瘍細胞でより低いレベルで活性を示すSPについては、活性を増強する化合物または薬剤が注目されることがある。いずれの場合にも同定される化合物としては候補癌治療薬となる薬剤を含む。

20

【0231】

数種のアッセイが本明細書に例示、記載されている。このプロテアーゼドメイン部分は他のアッセイでも使用できると考えられる。しかしここでは、一本鎖プロテアーゼドメインが触媒活性を示すことを示す。それ自体 *in vitro* スクリーニングアッセイに理想的なものである。

20

【0232】

CVSP14全長チモーゲン、活性化酵素、一本鎖および二本鎖プロテアーゼドメインは本明細書で提供されるものをはじめ当業者に公知のいずれのスクリーニングアッセイでの使用も考えられる。よって以下の記載がタンパク質分解アッセイに向けられたものであれば、CVSP14をはじめいずれのSPの一本鎖プロテアーゼドメインまたはその触媒活性部分の使用にも当てはまるものとする。本明細書では結合アッセイなどの他のアッセイ、特にそのスプライス変異体などのいずれかの変異体を含むCVSP14とともに用いるものが提供される。

30

【0233】

1. SPタンパク質のプロテアーゼ活性を調節する薬剤を同定する触媒アッセイ

本明細書では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部分の触媒活性のモジュレーターを同定する方法が提供される。これらの方法は、a) CVSP14、全長チモーゲンまたは活性型、特にその一本鎖ドメインを試験物質の存在下でCVSP14の基質と接触させ、その基質のタンパク質分解作用を検出し、それによりCVSP14の活性を評価し、その活性を対照と比較することによって実施できる。例えば対照は全長チモーゲンまたは活性型、特にその一本鎖ドメインをはじめとするCVSP14をCVSP14の基質と接触させ、その基質のタンパク質分解作用を検出し、それによりCVSP14の活性を評価することによって評価されるCVSP14の活性であってもよい。試験化合物の存在下と不在下での結果を比較する。活性の違いがその試験化合物がCVSP14の活性を調節することを示す。活性化のアクチベーターも考えられ、このようなアッセイを以下に述べる。

40

【0234】

ある実施形態では、上記スクリーニング法で複数の試験化合物が同時にスクリーニングされる。別の実施形態では、次に標的細胞に特異的である可能性のある薬剤を同定する手段として標的細胞からCVSP14を単離する。

50

【0235】

もう1つの実施形態では、試験化合物は治療化合物であり、これにより試験化合物の存在下および不在下で測定されたCVSP14活性の違いが標的細胞がその治療化合物に応答することを示す。

【0236】

ある方法は、(a)CVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインを1または複数の試験化合物と、そのリガンドと化合物との間の相互作用を助ける条件下で接触させ、さらに(b)その複数のものの中でそのリガンドと特異的に結合する1以上の化合物を同定するステップを含む。

【0237】

本明細書で提供されるもう1つの方法は、a)CVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインをCVSP14ポリペプチドの基質と接触させ、その基質のタンパク質分解作用を検出し、それによりCVSP14ポリペプチドの活性を評価し、b)CVSP14ポリペプチドを試験化合物の存在下でCVSP14ポリペプチドの基質と接触させ、その基質のタンパク質分解作用を検出し、それによりCVSP14ポリペプチドの活性を評価し、さらにc)ステップa)およびb)で評価したCVSP14ポリペプチドの活性を比較し、それによりステップa)で測定された活性とステップb)で測定された活性が異なっていれば、その試験物質がCVSP14ポリペプチドの活性を調節することを示す、というステップを含む。

【0238】

もう1つの実施形態では、複数の試験物質が同時にスクリーニングされる。試験物質の存在下と不在下でのCVSP14ポリペプチドの活性を比較してその試験物質がCVSP14ポリペプチドのモジュレーターであるかどうかを評価する際にはその活性を並行してアッセイする必要は必ずしもないが、このような並行測定が典型的である。ある時点でのCVSP14ポリペプチドの活性を測定し、その測定活性をCVSP14ポリペプチド活性の履歴値と比較することができる。

【0239】

例えば試験物質の存在下でのCVSP14ポリペプチド活性を測定し、試験物質の不在下で予め測定したCVSP14ポリペプチド活性の履歴値と比較することができ、逆も可能である。これは例えばアッセイを行うためのキットとともに提供されている添付書類またはパンフレットにCVSP14ポリペプチドの活性を示すことなし得る。

【0240】

特定のSPの基質を選択する方法は実施例に記載されており、特定のタンパク質分解アッセイが例示されている。

【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。

【0242】

さらに本明細書では上記の組合せを含むキットが提供される。このキットは所望によりCVSP14ポリペプチド活性のモジュレーターを同定するための説明書を含んでもよい。いずれのCVSP14ポリペプチドもその活性のモジュレーターを同定する標的と考えられる。

【0243】

2. 結合アッセイ

本明細書ではまた、CVSP14と結合する薬剤、特に化合物を同定および単離する方法が提供される。これらのアッセイはチモーゲン型、単離された一本鎖プロテアーゼドメイン(またはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインを含むCVSP14ポリペプチド以外のタンパ

10

20

30

40

50

ク質)、および全長チモーゲンまたは延長されたプロテアーゼドメインに由来する活性型をはじめとするその活性型と結合する薬剤を同定すべく設計されている。同定された化合物は腫瘍またはその他異常な血管形成を伴う疾患および疾病的治療用の化合物を同定するための候補またはリード化合物となる。本方法で用いるCVSP14ポリペプチドとしては、CVSP14一本鎖プロテアーゼドメインまたはそのタンパク質分解活性部分をはじめ、本明細書で定義されたいずれのCVSP14ポリペプチドも含む。

【0244】

本明細書では種々の方法が提供される。これら の方法は液相またはCVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインが直接またはリンカーを介して間接的に固相支持体に結合されている固相反応で行うことができる。スクリーニングアッセイは実施例に記載され、これらのアッセイを用いて候補化合物が同定されている。本明細書の目的では、上記の結合アッセイは全てCVSP14のために提供されている。

【0245】

本明細書ではCVSP14一本鎖プロテアーゼドメイン、チモーゲンまたは全長活性化CVSP14もしくはその二本鎖プロテアーゼドメインと特異的に結合する化合物などの薬剤を同定する方法が提供される。この方法は、(a)CVSP14を1または複数の試験薬剤と、CVSP14と薬剤の間の結合を助ける条件下で接触させ、さらに(b)その複数のものの中でCVSP14と特異的に結合する1以上の薬剤を同定することにより行うことができる。

【0246】

例えば、このような方法の実施においては、CVSP14ポリペプチドを可能性のある結合相手または細胞の抽出液もしくは画分と、可能性のある結合相手とポリペプチドの会合が可能な条件下で混合する。混合した後、CVSP14と会合したペプチド、ポリペプチド、タンパク質またはその他の分子を混合物から分離する。次に、CVSP14と結合した結合相手を取り出し、さらに分析することができる。結合相手を同定および単離するには例えば配列番号6の全開示タンパク質などの完全タンパク質を使用できる。あるいはそのタンパク質の断片を用いてもよい。

【0247】

細胞抽出液、または血液、血漿、尿、汗、滑液、CSFその他のこの種の体液などの体液を得るには種々の方法が使用できる。例えば物理的または化学的破碎法で細胞を破碎してもよい。物理的破碎法の例としては、限定されるものではないが、音波処理および機械剪断が挙げられる。化学溶解法の例としては、限定されるものではないが、界面活性剤溶解および酵素溶解が挙げられる。当業者ならば本方法で用いる抽出液を得るための細胞抽出液調製方法を容易に選定することができる。

【0248】

細胞抽出液が調製されれば、この抽出液とCVSP14を、このタンパク質と結合相手の会合が起こり得る条件下で混合する。ヒト細胞の細胞質内で見られるものに類似する条件をはじめ、種々の条件が使用できる。浸透圧、pH、温度および用いる細胞抽出液の濃度などの特徴はタンパク質と結合相手の会合を至適化すべく変更することができる。同様に体液から目的分子を単離する方法も公知である。

【0249】

適当な条件下で混合した後、結合した複合体を混合物から分離する。混合物を分離するには種々の技術が使用できる。例えばCVSP14に特異的な抗体を用いて結合相手複合体を免疫沈降させることができる。あるいはクロマトグラフィーおよび密度/沈降遠心分離などの標準的な化学的分離技術が使用できる。

【0250】

抽出液中の非会合細胞成分を除去した後、常法を用いて複合体から結合相手を解離させることができる。例えば解離は塩濃度または混合物のpHを変化させることで達成することができる。

【0251】

混合抽出液からの会合した結合相手ペアの分離を助けるため、CVSP14を固相支持体に固定

10

20

30

40

50

化してもよい。例えばこのタンパク質はニトロセルロースマトリックスまたはアクリルビーズに結合させることができる。タンパク質またはその断片を固相支持体へ結合させれば、その抽出液に見られる他の成分からペプチド／結合相手ペアを分離する際の助けとなる。同定された結合相手は単一のタンパク質か2以上のタンパク質からなる複合体のいずれかであり得る。

【0252】

あるいは一本鎖プロテアーゼをコードする核酸分子は酵母ツーハイブリッド系で使用できる。この酵母ツーハイブリッド系は他のタンパク質の相手のペアを同定するために用いられているが、本明細書に記載の核酸分子を用いるために容易に採用することができる。

【0253】

特にCVSP14に関する別の *in vitro* 結合アッセイでは少なくともこれらのタンパク質の1つの触媒ドメインおよび1以上の候補結合標的または基質を含むポリペプチド混合物を用いる。この混合物を適当な条件下でインキュベートした後、CVSP14または触媒ドメインを含むそのポリペプチド断片が候補基質と結合または相互作用する能力を評価する。細胞フリー結合アッセイでは、化合物のうち1つが検出可能な標識を含むか、または検出可能な標識と結合されている。この標識は放射性、発光、光学密度または電子密度などの直接検出用に提供することもできるし、あるいはエピトープタグ、酵素などの間接的検出用に提供することもできる。標識および他のアッセイ成分の性質に応じ、標識を検出するには種々の方法が使用できる。例えば標識は固相支持体に結合したものを検出することもできるし、あるいは標識を含む結合複合体部分を固相支持体から分離して、その後標識を検出することもできる。

【0254】

3. シグナル伝達の検出

分泌されたCVSP14などのCVSPは、細胞表面レセプターと結合または相互作用することで直接、あるいはシグナル伝達を開始させ得るプロ増殖因子などのタンパク質を活性化することで間接的にシグナル伝達に関与し得る。シグナル伝達を評価するアッセイは当業者に周知のものであり、CVSP14ポリペプチドとともに用いるためにも採用することができる。

【0255】

CVSP14、特に全長または細胞表面にCVSPの細胞外ドメインまたはその機能的部分を固定させるに十分な部分により直接、またはプロ増殖因子の活性化を介して間接的に媒介されるシグナル伝達に影響を及ぼす、または変化をもたらす薬剤を同定するアッセイが提供される。このようなアッセイには例えば、リポーター遺伝子からの発現に対する作用を検出することにより伝達されたシグナルの調節作用を評価する転写に基づくアッセイが挙げられる(例えば米国特許第5,436,128号参照)。

【0256】

4. CVSP14をコードする核酸の発現を調節する薬剤を同定する方法

もう1つの実施形態ではCVSP14をコードする核酸の発現を調節する薬剤を同定する方法を提供する。このようなアッセイではCVSP14をコードする核酸の発現レベルの変化をモニタリングするいずれかの利用可能な手段を用いる。

【0257】

あるアッセイ形式では、CVSP14またはそのドメイン、特にプロテアーゼドメインのオープンリーディングフレームとアッセイ可能ないずれかの融合相手との間のリポーター遺伝子融合物を含む細胞株を調製することができる。ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をはじめ多くのアッセイ可能な融合相手が公知であり、容易に利用できる(Alam et al., Anal. Biochem. 188: 245-54 (1990))。次にこのリポーター遺伝子融合物を含む細胞株を適当な条件および時間で試験薬剤に曝す。薬剤に曝したサンプルと対照サンプル間のリポーター遺伝子の発現の違いにより、CVSP14をコードする核酸の発現を調節する薬剤が同定される。

【0258】

さらなるアッセイ形式を用い、薬剤がCVSP14をコードする核酸の発現を調節する能力をモ

10

20

30

40

50

ニタリングすることもできる。例えば核酸とのハイブリダイゼーションによりmRNAの発現を直接モニタリングすることができる。細胞株を適当な条件および時間で試験薬剤に曝し、標準的な手法により全RNAまたはmRNAを単離する(例えば、Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 参照)。これらの核酸から、薬剤に曝した細胞と対照細胞の間のRNA発現レベルにおける差を検出するためのプローブを調製することができる。必ずしも必要ではないが、高ストリンジエンシー条件下で標的核酸とだけハイブリダイズするプローブを設計するのが典型的である。高ストリンジエンシー条件下では相補性の高い核酸ハイブリッドだけが生じる。従って、アッセイ条件のストリンジエンシーはハイブリッドを形成するために2つの核酸鎖の間に存在しなければならない相補性の程度を決定する。ストリンジエンシーはプローブ:標的ハイブリッドと存在し得るプローブ:非標的ハイブリッド間の安定性の差が最大となるように選択しなければならない。

10

【0259】

プローブは当技術分野で公知の方法により核酸から設計することができる。例えば、プローブのG+C含量およびプローブ長はプローブの標的配列との結合に影響を与える。プローブの特異性を至適化する方法もよく用いられる(例えば、Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; およびAusubel et al. (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY参照)。

20

【0260】

ハイブリダイゼーション条件は各プローブの必要に応じて公知の方法を用いて改変する(例えば、Sambrook et al. (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press); およびAusubel et al. (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY参照)。全細胞RNAまたはポリA RNA富化RNAのハイブリダイゼーションは利用可能ないずれの形式によっても達成することができる。例えば全細胞RNAまたはポリA RNA富化RNAは固相支持体に固定することができ、この固相支持体を少なくとも1種の核酸分子、または1種の核酸分子の一部を含む少なくとも1種のプローブに、そのプローブが特異的にハイブリダイズする条件下で曝す。あるいは少なくとも1種の配列、または1種の配列の一部を含む核酸断片を多孔質ガラスウエハーなどの固相支持体に固定化してもよい。次にこのガラスウエハーをサンプル由来の全細胞RNAまたはポリA RNAに、固定化した配列が特異的にハイブリダイズする条件下で曝すことができる。このようなガラスウエハーおよびハイブリダイゼーション法は広く利用でき、例えばBeattie (WO 95/11755)が開示したものがある。あるプローブが非処理細胞集団および薬剤に曝した細胞集団からのRNAサンプルと特異的にハイブリダイズする能力を調べることにより、CVSP14ポリペプチドをコードする核酸の発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートする薬剤が同定される。

30

【0261】

ある形式では、非曝露対照細胞集団に対する、試験薬剤に曝した細胞集団の相対的タンパク質量をアッセイすることができる(例えば、前立腺癌細胞株、肺癌細胞株、大腸癌細胞株、または乳癌細胞株)。この形式では、特異的抗体などのプローブを用いて種々の細胞集団または体液中のタンパク質の発現または活性レベルの違いをモニタリングする。細胞株または集団または体液は適当な条件および時間で試験薬剤に曝す。細胞溶解液または体液は曝露した細胞株または集団と対照となる非曝露細胞株または集団または非曝露体液から調製することができる。これらの細胞溶解液または体液を次にプローブを用いて分析する。

40

【0262】

例えば、CVSP14のNおよびC末端断片を細菌内で発現させ、これを用いてこれらの断片と結合するタンパク質を探すことができる。CVSP14のNまたはC末端領域に対するHis-タグまたはGSTの融合など、基質として用いる融合タンパク質を調製することができる。これらの融合タンパク質は例えばグルタチオン-セファロースビーズに結合させた後、細胞溶解液

50

または体液でプロービングすることができる。溶解前に細胞または体液はCVSP14またはそのドメインと相互作用するタンパク質を調節し得る候補薬剤で処理することができる。融合タンパク質と結合する溶解タンパク質は当技術分野で公知のように、SDS-PAGEにより分離し、単離し、タンパク質配列決定または質量分析によって同定することができる。

【0263】

抗体プローブはそれらが十分な長さであれば(例えば、CVSP14ポリペプチドの4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40またはそれ以上の連続するアミノ酸)ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を用いて、あるいは免疫原性を増強する必要があれば好適な担体と結合させて、適当な免疫化プロトコールで好適な哺乳類宿主を免疫化することで作製される。ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペット・ヘモシアニン(KLH)またはその他の担体タンパク質などの担体による免疫コンジュゲートの調製方法は当技術分野で周知のものである。例えばカルボジイミド試薬を用いた直接コンジュゲーションが有効な場合もあるし、Pierce Chemical Co., Rockford, ILが供給しているものなどの架橋試薬がハプテンに接近性を与える上で望ましい場合もある。ハプテンペプチドは例えば担体との結合を促進すべく、Cys残基を有する、またはシステイン残基が散在したアミノまたはカルボキシ末端のいずれかで延長し得る。免疫原の投与は当技術分野で一般に理解されているように適切な期間、適切なアジュバントを用いて通常注射により行う。免疫化過程では抗体の力価を求め、抗体形成の妥当性を調べる。

【0264】

抗ペプチド抗体は例えばCVSP14のカルボキシ末端アミノ酸に相当する合成ペプチドを用いて作製することができる。合成ペプチドは1~3アミノ酸長、通常は少なくとも4以上のアミノ酸残基長といった短いものであってよい。これらのペプチドは標準的な方法を用いてKLHに結合させることができ、ウサギまたは有蹄類などの動物へ感作させることができる。次に例えば共有結合ペプチドを含むActigelビーズを用いてポリクローナル抗体を精製することができる。

【0265】

このようにして作製されたポリクローナル抗血清はいくつかの適用には満足のいくものであるが、医薬組成物としてはモノクローナル製剤が一般に用いられる。目的のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株はKohler et al., (Nature 256: 495-7 (1975))の標準的な方法、または一般に知られているようにリンパ球または脾臓細胞の不死化を行う改変法を用いて作製することができる。目的抗体を分泌する不死化細胞株は、抗体がペプチドハプテン、ポリペプチドまたはタンパク質である免疫アッセイによってスクリーニングされる。目的抗体を分泌する適当な不死化細胞培養物が確認されれば、これらの細胞を *in vitro* または腹水により *in vivo* 產生させることで培養することができる。CVSP14の触媒ドメインを認識するモノクローナル抗体が特に注目される。

【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'、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。

【0267】

これらの抗体またはフラグメントも製造可能である。また、複数種の起源を持つキメラに関してはレセプターの目的領域に特異的に結合する領域を作製することもできる。

【0268】

上記方法でアッセイされる薬剤は無作為に選択することもできるし、あるいは合理的に選択または設計することもできる。

【0269】

10

20

30

40

50

薬剤は例えばペプチド、小分子および炭水化物であってもよい。当業者ならば薬剤の構造特性については制限がないことが容易に分かるであろう。

【0270】

ペプチド薬剤は当技術分野で公知のように標準的な固相(または液相)ペプチド合成法を用いて調製することができる。さらにこれらのペプチドをコードするDNAも市販のオリゴ又クレオチド合成装置を用いて合成し、標準的な組換え生産系を用いて組換え生産することができる。遺伝子にコードされないアミノ酸が含まれる場合には固相ペプチド合成を用いた生産が必要となる。

【0271】

G. CVSP14ポリペプチドの少なくとも1つの活性を調節する試験物質のアッセイ形式および選択 10

CVSP14の少なくとも1つの活性を調節する薬剤の同定方法を提供する。これらの方にはファージディスプレーおよびその他CVSP14の活性における変化を評価する方法が含まれる。このような方法またはアッセイでは目的の活性をモニタリングまたは検出するいずれの手段を用いてもよい。スクリーニングアッセイを行うには種々の形式および検出プロトコールが知られている。このような形式およびプロトコールのいずれかをCVSP14ポリペプチド活性のモジュレーターの同定に採用することができる。以下、プロトコール例について述べる。

【0272】

1. ハイスループットスクリーニングアッセイ

上記のアッセイは単一のCVSP14ポリペプチドをスクリーニングする、かつ/または1回のアッセイで単一の試験物質をスクリーニングする場合に実施することもできるが、このアッセイは典型的にはハイスループットスクリーニング方式、すなわち複数のSPタンパク質が、かつ/または複数の試験物質に対して同時にスクリーニングされる方式で実施される(一般には、High Throughput Screening: The Discovery of Bioactive Substances (Devlin, Ed.) Marcel Dekker, 1997; Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1:38 4-91 (1997); およびSilverman et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:397-403 (1998)参照)。例えば、このアッセイはマルチウェル(例えば、24、48、96、384、1536ウェル、またはそれ以上の密度)、チップまたはアレイ形式で行うことができる。

【0273】

ハイスループットスクリーニング(HTS)は疾病標的に対して多数の多様な化学構造を調べて「ヒット」を確認する方法である(Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1: 384-91 (1997))。HTS法の分野の現在の水準はサンプル調製、アッセイ手順およびその後の膨大なデータの処理を取り扱うべく高度に自動化およびコンピューター化されている。

【0274】

ハイスループットスクリーニングで用いられる検出技術は検討する生化学経路の種類によって異なる(Sittampalam et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 1:384-91 (1997))。これらの方法としては、種々の酵素アッセイに採用できるシンチレーションプロキシミティーアッセイ(SPA)などの放射性化学法(Lerner et al., J. Biomol. Screening, 1:135-143 (1996); Baker et al., Anal. Biochem., 239:20-24 (1996); Baum et al., Anal. Biochem., 237:129-134 (1996); およびSullivan et al., J. Biomol. Screening 2:19-23 (1997))およびタンパク質-タンパク質相互作用アッセイ(Braunwalder et al., J. Biomol. Screening 1:23-26 (1996); Sonatore et al., Anal. Biochem. 240:289-297 (1996); およびChen et al., J. Biol. Chem. 271:25308-25315 (1996))、ならびに限定されるものではないが比色および発光検出法、共鳴エネルギー転移(RET)法、時間分解蛍光(HTRF)法、細胞蛍光アッセイ、例えば蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)法(例えば、Gonzalez et al., Biophys. J., 69:1272-1280 (1995)参照)、蛍光偏光または異方性法(例えば、Jameson et al., Methods Enzymol. 246:283-300 (1995); Jolley, J. Biomol. Screening 1:33-38 (1996); Lynch et al., Anal. Biochem. 247:77-82 (1997))、蛍光補正分光光度法、その他この種の方法をはじめとする非同位元素的検出法が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0275】

2. 試験物質

小分子、抗体、タンパク質、核酸、ペプチド、ならびにそれらのライブラリーおよびコレクションを含む試験化合物は上記アッセイおよび以下に記載するCVSP14ポリペプチド活性を調節する化合物を同定するためのアッセイでスクリーニングすることができる。候補化合物をスクリーニングおよび同定するにはコンピューター化学を利用した合理的創薬の方法論を用いることができる。

【0276】

これらのスクリーニング法によって同定される化合物としてはアンタゴニストをはじめとする阻害剤が挙げられ、またアゴニストであってもよい。スクリーニングのための化合物としては、利用できる、既知の、または作製可能ないずれの化合物および化合物コレクションも含む。

【0277】

a. 化合物の選択

化合物はそれらのセリンプロテアーゼ、特にCVSP14ポリペプチドの阻害の効力および選択性に関して選択できる。本明細書に記載するように、また、周知のように、標的セリンプロテアーゼおよびその基質はプロテアーゼとその基質の反応を可能とするアッセイ条件下で合わせる。アッセイは試験化合物の不在下と増加濃度の試験化合物の存在下で行う。セリンプロテアーゼ活性の50%が試験化合物によって阻害される試験化合物濃度が、その化合物のIC50値(阻害剤濃度)またはEC50値(有効濃度)である。一連の、または一群の試験化合物の中でIC50またはEC50値が高い化合物よりもIC50またはEC50値が低いものほど、より強力なセリンプロテアーゼ阻害剤であると考えられる。このIC50測定は比較的単純なアッセイに用いられ、EC50は細胞を用いるものなどより複雑なアッセイ用いられる場合が多い。

【0278】

候補化合物は、CVSP14ポリペプチド活性の阻害に関して *in vitro*アッセイで測定した場合、100nM以下のIC50値を持つのが典型である。これらの試験化合物はまたセリンプロテアーゼに対する選択性でも評価する。本明細書に記載するように、また周知のように、試験化合物はセリンプロテアーゼおよびその他の酵素のパネルに対してその効力をアッセイし、それぞれのアッセイ系で各試験化合物のIC50値またはEC50値を求める。標的酵素、例えばCVSP14ポリペプチドに対して低いIC50値またはEC50値を示し、かつ、試験パネル内の他の酵素(例えば、ウロキナーゼ組織プラスミノーゲンアクチベーター、トロンビン、Xa因子)に対して高いIC50値またはEC50値を示す化合物がその標的酵素に対して選択性があると考えられる。一般に標的酵素アッセイにおけるIC50値またはEC50値が選択性酵素パネルにおいて測定された、その次に小さいIC50値またはEC50値よりも少なくとも1オーダー小さければその化合物は選択性があるとみなす。

【0279】

化合物はまたそれらの *in vivo*活性についても評価する。試験化合物の評価のために選択されるアッセイの種類はその化合物によって治療または予防しようとする病態、ならびに試験化合物について評価しようとする投与経路によって異なる。

【0280】

例えば

CVSP14ポリペプチドの阻害によって腫瘍増殖を減退させる化合物の活性を評価するにはJankun et al., Canc. Res. 57:559-563 (1997)が記載したPAI-1評価のための方法が使用できる。要するに、ATCC細胞株DU145およびLnCaPをSCIDマウスに注射する。腫瘍が確立した後、その化合物の *in vitro*特性から決定した投与計画に従ってマウスに試験化合物を与える。Jankun et al.は化合物を水で投与した。約5週間の間、週に2回腫瘍の体積を測定した。化合物を投与した動物が適当な対照化合物を投与した動物に比べて腫瘍体積の低下を示せば、その化合物は活性があるとみなす。

【0281】

10

20

30

40

50

腫瘍体積の減少に対するブタプロテアーゼ阻害剤p-アミノベンズアミジンの作用を評価すべく設計した別の *in vivo* 試験モデルが Billstrom et al., Int. J. Cancer 61:542-547 (1995)により記載されている。

【0282】

化合物が転移の発生を軽減する、または転移を抑制する能力を評価するには、 Kobayashi et al. Int. J. Canc. 57:727-733d (1994)が記載している手法を使用することができる。要するに、肺定着能の高いものとして選択したネズミ異種移植片を C57B1/6マウスへ静脈注射(実験的転移)または腹壁へ皮下注射(自発的転移)する。試験する種々の濃度の化合物は注射前にマトリゲル中の腫瘍細胞に混合させればよい。腫瘍接種後1~6日目かまたは7~13日目かのどちらかに試験化合物の腹腔内注射を毎日行った。この動物を腫瘍接種後約3~4週間で犠牲にし、肺の腫瘍コロニーを計数する。得られたデータの評価から試験化合物、最適用量および投与経路の効果に関する判断が可能となる。

【0283】

腫瘍体積および転移の減少に対する試験化合物の活性は、それらの阻害剤を評価するための Rabbani et al., Int. J. Cancer 63:840-845 (1995)に記載のモデルで評価できる。そこへ、 Mat LyLu腫瘍細胞をコペンハーゲンラットの脇腹に注射した。継続して種々の用量の試験化合物を最高3週間投与するため、この動物に浸透圧小型ポンプを埋め込んだ。試験中、転移が増大するにつれ、実験動物および対照動物の腫瘍重および腫瘍体積を評価した。得られたデータの評価から試験化合物、最適用量および投与経路の効果に関する判断が可能となる。これらの著者のうち何人かが Xing et al., Canc. Res. 57:3585-3593 (1997)に関連プロトコールを記載している。

【0284】

化合物の抗血管形成活性を評価するには、ウサギ角膜の血管新生モデルを使用することができる(例えば、 Avery et al. (1990) Arch. Ophthalmol., 108:1474-147参照)。 Avery et al. はニュージーランド白ウサギを麻酔した後、角膜中央の切開を行い、放射状の角膜ポケットを形成することを記載している。徐放性のプロスタグランジンペレットをこのポケット内に置き、血管新生を誘発した。試験化合物を5日間腹腔内投与し、その時点で動物を犠牲にした。試験化合物の作用は、血管新生応答およびそれによる角膜縁の血管新生の面積を算出するのに使用できる角膜輪部を撮影した断続写真を観察して評価する。適当な対照と比較して血管新生の領域が小さくなればその試験化合物が血管新生の減少または阻害に有効であることを示す。

【0285】

血管形成の抑制における試験化合物の効果を評価するのに用いる血管形成モデルは Min et al., Canc. Res. 56:2428-2433 (1996)に記載されている。C57BL6マウスに、血管形成誘発剤として bFGF を含むマトリゲル混合物を試験化合物とともに、また化合物を伴わずに皮下注射した。5日後、この動物を犠牲にし、血管新生を可視化できるマトリゲルプラグを撮影する。マトリゲルおよび有効量の試験化合物を投与した実験動物は、対照動物もしくは有効量未満の、または有効量を含まない化合物を投与した実験動物よりも低い血管新生を示した。

【0286】

一次腫瘍の拡散を制限する能力について化合物を試験すべくデザインされた *in vivo* 系が、 Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5021-5025 (1993)に記載されている。又一ドマウスに、CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)を発現するよう操作した腫瘍細胞(PC3)を注射する。腫瘍サイズおよび/または転移を減少させるそれらの能力について試験する化合物を動物に投与した後、腫瘍サイズおよび/または転移増殖の測定を行う。さらにまた、種々の臓器で検出されたCATレベルは試験化合物の転移阻害能の指標となり、対照動物に対して処理動物の組織でCATの検出が少なければその組織に移動したCAT発現細胞が少ないことを示す。

【0287】

In vivo 実験様式は、侵襲性が高いことが知られている腫瘍細胞系 F3II を用い、試験セリ

10

20

30

40

50

ンプロテアーゼ阻害剤の抑制能を評価するように計画する(例えば、Alonso et al., Breast Canc. Res. Treat. 40:209-223 (1996)参照)。Alonsoは毒性測定、腫瘍増殖、侵襲性、自発的転移、実験的肺転移、および血管形成アッセイに関するin vivo研究を記載している。

【0288】

CAMモデル(ニワトリ胚縫毛尿膜モデル)は最初に1998年にL. Ossowski(J. Cell Biol. 107:2437-2445 (1988))によって記載されたが、これは試験化合物の阻害活性を評価するもう一つの方法を提供する。CAMモデルでは、腫瘍細胞はいくつかのセリンプロテアーゼ阻害剤の存在下で腫瘍細胞を有するCAMを含む縫毛尿膜を通じて浸潤するが、その結果、膜を経た腫瘍細胞の浸潤は少ないか全くない。従って、CAMアッセイは種々の濃度の試験化合物の存在下および不在下でCAMおよび腫瘍細胞を用いて実施する。腫瘍細胞の侵襲性は化合物の阻害活性の指標となるような条件下で測定する。阻害活性を有する化合物は腫瘍浸潤が低いことと関係する。

【0289】

CAMモデルは標準の血管形成アッセイにも用いられる(すなわち、新しい血管の形成に作用する)(Brooks et al. Methods in Molecular Biology 129:257-269 (1999))。このモデルによれば、塩基性纖維芽細胞増殖因子(bFDG)などの血管形成インデューサーを含むフィルターディスクをCAM上に置く。サイトカインのCAM中への拡散が局部的な血管形成を誘発し、これはフィルターディスクのすぐ下のCAM内の血管分岐点の数を計数するなどいくつかの方法で測定できる。同定された化合物のサイトカイン誘発性血管形成阻害能はこのモデルを用いて試験することができる。試験化合物は血管形成インデューサーを含むフィルターディスクに加えてよいし、膜に直接置いてよいし、全身投与してもよい。試験化合物の存在下および/または不在下での新規の血管形成の程度はこのモデルを用いて比較することができる。試験化合物の存在下で新しい血管の形成が少ないことが、抗血管形成活性の指標となる。CVSP14ポリペプチドの阻害剤に対する抗血管形成活性を証明することは、そのSPタンパク質の血管形成における役割を示すものである。

【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., Citokine, 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(Ravichandran, 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)、(Li, Y. et al. Arch. Biochem. Biophys. 370:112-8 (1999));Bukunin(Cui, C.Y. et al. J. Invest. Dermatol. 113:182-8 (1999));メシリ酸ナファモスタッフ(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. 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-トシリ-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

10

20

30

40

50

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));ONO-3403(Hiwasa et al., *Cancer Lett.* 126:221-5 (1998));ブデラスタシン(Bd ellastasin)(Moser et al. *Eur. J. Biochem.* 253:212-20 (1998));ピクニン(Xu et al. *J. Mol. Biol.* 276:955-66 (1998));メシリ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.* 15:294 4-53 (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));メシリ酸ガベキサート(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-トシリ-L-リシリ-クロロメチルケトン(TL CK)(Bourinbaiar, A.S., et al., *Cell Immunol.*, 155(1):230-6 (1994));Smpi56(Ghender, 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(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));メシリ酸カモスタット(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. Des.*, 141(4 Pt 1):884-8 (1990));P-トルエンスルホニル-L-アルギニンメチルエステル(TAME)(Scuderi, P., *J. Immunol.*, 10 50

143(1):168-73 (1989)); 1-抗キモトリプシン(Abraham, C.R., et al., *Cell*, 52(4):48 7-501 (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)); デ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)); メシリ酸ガベキサート(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(Duffer, 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。

【0291】

c. コンビナトリアルライブラリーおよびその他のライブラリー

スクリーニングアッセイのための化合物源は、限定されるものではないが、コンビナトリアルライブラリーをはじめとするライブラリーであってよい。コンビナトリアルライブラリーの合成法およびかかるコンビナトリアルライブラリーの特徴は当技術分野において公知である(一般的に、Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential (Cortese Ed.) Walter de Gruyter, Inc., 1995; Tietze and Lieb, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2(3):363-71 (1998); Lam, *Anticancer Drug Des.*, 12(3):145-67 (1997); Blaney and Martin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1(1):54-9 (1997); および Schultz and Schultz, *Biotechnol. Prog.*, 12(6):729-43 (1996)参照)。

【0292】

様々なライブラリー、主にペプチドおよびヌクレオチドに基づくオリゴマーライブラリーを生成する方法および戦略は、分子生物学的方法および/または同時化学合成方法論を用いて開発されてきた(例えば、Dower et al., *Annu. Rep. Med. Chem.*, 26:271-280 (1991); Fodor et al., *Science*, 251:767-773 (1991); Jung et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31:367-383 (1992); Zuckerman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4505-4509 (1992); Scott et al., *Science*, 249:386-390 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); および Gallop et al., *J. Medicinal Chemistry*, 37:1233-1251 (1994)参照)。得られるコンビナトリアルライブラリーは何百万もの化合物を含む可能性があり、これをスクリーニングして選択した活性を示す化合物を同定することができる。

【0293】

このライブラリーは大きく3つのカテゴリー: ランダムペプチドまたはタンパク質が、プラスミドから発現したファージ粒子またはタンパク質の表面に提示される融合タンパク質ディスプレーペプチドライブラリー; 個々の化合物または化合物の混合物が、樹脂ビーズ(例えば、Lam et al., *Nature*, 354:82-84 (1991)参照)および綿支持体(例えば、Eichler et al., *Biochemistry* 32:11035-11041 (1993)参照)などの不溶性マトリックス上に提示される支持体結合合成化学ライブラリー; および、これらの化合物を液相で用いる方法(例えば、Houghten et al., *Nature*, 354:84-86 (1991); Houghten et al., *BioTechniques*, 13:412-421 (1992); および Scott et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:40-48 (1994)参照)に分類される。合成ペプチドおよびオリゴヌクレオチドコンビナトリアルライブラリーには多数の例があり、非ペプチド系有機小分子を含むライブラリーの作製には多くの方法がある。このようなライブラリーは、合して多様な有機分子の混合物を形成する、または合して選択されたファーマコフォア(薬理的作用団)モノマーに基づくライブラリーを形成し得るモノマーの基本セットに基づくものであり得る。

【0294】

ランダムコンビナトリアルライブラリーまたは決定論的コンビナトリアルライブラリーのいずれもがここで開示および/または請求されるスクリーニング方法によってスクリーニングされる。

ング可能である。これら2つのライブラリーでは、このライブラリーの各ユニットが固相支持体上で単離および／または固定化できる。決定論的ライブラリーでは、先駆的に各固相支持体上の特定のユニットの位置が分かれている。ランダムライブラリーでは、特定のユニットの位置は先駆的には分からぬが、各部位はなお単一の独特のユニットを含む。ライブラリーを作成する多くの方法が当業者に公知である(例えば、Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002 (1984), Houghten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5131-5135 (1985)参照)。当業者に公知のいずれの技術によって作成されるコンビナトリアルライブラリーも意図される(例えば、スクリーニングに関してはSchultz and Schultz, Biotechnol. Prog., 12(6):729-43 (1996)の表1; Bartel et al., Science, 261:1411-1418 (1993); Baumbach et al. BioPharm, (Can):24-35 (1992); Bock et al. I. Nature, 355:564-566 (1992); Borman, S., Combinatorial chemists focus on small molecules molecular recognition, and automation, Chem. Eng. News, 2(12):29 (1996); Boublik, et al., Eukaryotic Virus Display: Engineering the Major Surface Glycoprotein of the *Autographa California* Nuclear Polyhedrosis Virus (ACNPV) for the Presentation of Foreign Proteins on the Virus Surface, Bio/Technology, 13:1079-1084 (1995); Brenner, et al., Encoded Combinatorial Chemistry, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:5381-5383 (1992); Caflisch, et al., Computational Combinatorial Chemistry for De Novo Ligand Design: Review and Assessment, Perspect. Drug Discovery Des., 3:51-84 (1995); Cheng, et al., Sequence-Selective Peptide Binding with a Peptido-A,B-trans-steroidal Receptor Selected from an Encoded Combinatorial Library, J. Am. Chem. Soc., 118:1813-1814 (1996); Chu, et al., Affinity Capillary Electrophoresis to Identify the Peptide in A Peptide Library that Binds Most Tightly to Vancomycin, J. Org. Chem., 58:648-652 (1993); Clackson, et al., Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries, Nature, 352:624-628 (1991); Combs, et al., Protein Structure-Based Combinatorial Chemistry: Discovery of Non-Peptide Binding Elements to Src SH3 Domain, J. Am. Chem. Soc., 118:287-288 (1996); Cwirla, et al., Peptides On Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:6378-6382 (1990); Ecker, et al., Combinatorial Drug Discovery: Which Method will Produce the Greatest Value, Bio/Technology, 13:351-360 (1995); Ellington, et al., In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands, Nature, 346:818-822 (1990); Ellman, J.A., Variants of Benzodiazepines, J. Am. Chem. Soc., 114:10997 (1992); Erickson, et al., The Proteins; Neurath, H., Hill, R.L., Eds.: Academic: New York, 1976; pp. 255-257; Felici, et al., J. Mol. Biol., 222:301-310 (1991); Fodor, et al., Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis, Science, 251:767-773 (1991); Francisco, et al., Transport and Anchoring of Beta-Lactamase to the External Surface of *E. Coli*., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:2713-2717 (1992); Georgiou, et al., Practical Applications of Engineering Gram-Negative Bacterial Cell Surfaces, TIBTECH, 11:6-10 (1993); Geysen, et al., Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Glaser, et al., Antibody Engineering by Condon-Based Mutagenesis in a Filamentous Phage Vector System, J. Immunol., 149:3903-3913 (1992); Gram, et al., In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library, Proc. Natl. Acad. Sci., 89:3576-3580 (1992); Han, et al., Liquid-Phase Combinatorial Synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:6419-6423 (1995); Hoogenboom, et al., Multi-Subunit Proteins on the Surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody(Fab) Heavy and Light Chains, Nucleic Acids Res., 19:4133-4137 (1991); Houghten, et al., General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of 50

Individual Amino Acids, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:5131-5135 (1985); Houghten, et al., The Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for the Determination of Peptide Ligands in Radio-Receptor Assays-Opiod-Peptides, Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:405-412 (1993); Houghten, et al., Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery, Nature, 354:84-86 (1991); Huang, et al., Discovery of New Ligand Binding Pathways in Myoglobin by Random Mutagenesis, Nature Struct. Biol., 1:226-229 (1994); Huse, et al., Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda, Science, 246:1275-1281 (1989); Janda, K.D., New Strategies for the Design of Catalytic Antibodies, Biotechnol. Prog., 6:178-181 (1990); 10 Jung, et al., Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 31:367-486 (1992); Kang, et al., Linkage of Recognition and Replication Functions By Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:4363-4366 (1991a); Kang, et al., Antibody Redesign by Chain Shuffling from Random Combinatorial Immunoglobulin Libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:11120-11123 (1991b); Kay, et al., An M13 Phage Library Displaying Random 38-Amino-Acid-Peptides as a Source of Novel Sequences with Affinity to Selected Targets Genes, Gene, 128:59-65 (1993); Lam, et al., A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, Nature, 354:82-84 (1991)(Nature, 358:434 (1992)およびNature, 360:768 (20 1992)の正誤表で公開); Lebl, et al., One Bead One Structure Combinatorial Libraries, Biopolymers (Pept. Sci.), 37:177-198 (1995); Lerner, et al., Antibodies without Immunization, Science, 258:1313-1314 (1992); Li, et al., Minimization of a Polypeptide Hormone, Science, 270:1657-1660 (1995); Light, et al., Display of Dimeric Bacterial Alkaline Phosphatase on the Major Coat Protein of Filamentous Bacteriophage, Bioorg. Med. Chem. Lett., 3:1073-1079 (1992); Little, et al., Bacterial Surface Presentation of Proteins and Peptides: An Alternative to Phage Technology, Trends Biotechnol., 11:3-5 (1993); Marks, et al., By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Matthews, et al., Substrate Phage: Selection of Protease Substrates by Monovalent Phage Display, Science, 260:1113-1117 (1993); McCafferty, et al., Phage Enzymes: Expression and Affinity Chromatography of Functional Alkaline Phosphatase on the Surface of Bacteriophage, Protein Eng., 4:955-961 (1991); 30 Menger, et al., Phosphatase Catalysis Developed Via Combinatorial Organic Chemistry, J. Org. Chem., 60:6666-6667 (1995); Nicolaou, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 34:2289-2291 (1995); Oldenburg, et al., Peptide Ligands for A Sugar-Binding Protein Isolated from a Random Peptide Library, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:5393-5397 (1992); Parmley, et al., Antibody-Selectable Filamentous fd Phage Vectors: Affinity Purification of Target Genes, Genes, 73:305-318 (1988); Pinilla, et al., Synthetic Peptide Combinatorial Libraries (SPCLS)--Identification of the Antigenic Determinant of Beta-Endorphin Recognized by Monoclonal Antibody-3 E7, Gene, 128:71-76 (1993); Pinilla, et al., Review of the Utility of Soluble Combinatorial Libraries, Biopolymers, 37:221-240 (1995); Pistor, et al., Expression of Viral Hemagglutinin On the Surface of E. Coli., Klin. Wochenschr., 66:110-116 (1989); Pollack, et al., Selective Chemical Catalysis by an Antibody, Science, 234:1570-1572 (1986); Rigler, et al., Fluorescence Correlations, Single Molecule Detection and Large Number Screening: Applications in Biotechnology, J. Biotechnol., 41:177-186 (1995); Sarvetnick, et al., Increasing the Chemical Potential of the Germ-Line Antibody Repertoire, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:4008-4011 (1993); Sastry, et al., Cloning of the Immunological Repertoire in Escherichi 40 50

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

10

20

30

【0295】

例えば、CVSP14ポリペプチドまたはSPタンパク質のプロテアーゼドメインと結合するペプチドはファージディスプレーライブラリーを用いて同定できる。例としての実施形態では、この方法には、a)ファージライブラリーのファージをCVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインに接触させ;(b)そのタンパク質と結合するファージを単離し;さらに(c)単離したファージにコードされる少なくとも1つのペプチドを同定し、CVSP14ポリペプチドと結合するペプチドを同定することを含み得る。

【0296】

H. CVSP14ポリペプチド活性のモジュレーター

本明細書では、スクリーニングにより同定された、あるいはその他のスクリーニング方法でCVSP14ポリペプチドまたはプロテアーゼドメインを用いて生成された、CVSP14活性を調節する化合物を提供する。これら化合物は直接CVSP14ポリペプチドと相互作用することによって作用するか、またはその転写または翻訳を変化させることによって作用する。このような分子としては、限定されるものではないが、CVSP14ポリペプチド、特にそのプロテアーゼドメインと特異的に反応する抗体、CVSP14ポリペプチド、抗体、ペプチドミメティクスおよびその他このような化合物の発現を変化させるアンチセンス核酸またはRNAiなどの二本鎖RNA(dsRNA)が挙げられる。

40

【0297】

1. 抗体

本明細書で提供されるCVSP14ポリペプチド、特にその一本鎖プロテアーゼドメインあるいは全長またはプロテアーゼドメインの活性型またはチモーゲン型と特異的に結合するポリクローナルおよびモノクローナル抗体をはじめとする抗体が提供される。

40

【0298】

一般に、この抗体はモノクローナル抗体であり、典型的にはこの抗体はCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと特異的に結合する。特定の実施形態では、CVSP14の各々の一本鎖プロテアーゼドメインに対する抗体が提供される。また、CVSP14のいずれかのドメインおよびその二本鎖と特異的に結合する抗体も提供される。

50

【0299】

CVSP14ポリペプチドおよびそのドメイン、断片、ホモログおよび誘導体を免疫原として用いて、そのような免疫源と特異的に結合する抗体の作製することができる。このような抗体としては、限定されるものではないが ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一

本鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライプラリーなどが挙げられる。特定の実施形態では、ヒトCVSP14ポリペプチドに対する抗体が生産される。もう1つの実施形態では、セリンプロテアーゼドメインを含むCVSP14ポリペプチド断片からなる複合体を抗体作製の免疫原として用いる。

【0300】

当技術分野で公知の種々の手法は、CVSP14ポリペプチド、そのドメイン、誘導体、断片または類似体に対するポリクローナル抗体の作製に用いることができる。抗体の作製のためには、天然CVSP14ポリペプチドまたは合成形態、あるいは架橋CVSP14ポリペプチドなど上記の誘導体を注射して種々の宿主動物を免疫化することができる。このような宿主動物としては、限定されるものではないが、ウサギ、マウス、ラットなどが挙げられる。種々のアジュバントを用いて宿主の種に応じた免疫応答を増強することができ、限定されるものではないが、フロイントのアジュバント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、リソレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルション、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、ならびに弱毒ウシ結核菌(*bacille Calmette-Guerin(BCG)*)およびコリネバクテリウム・パルブム(*corynebacterium parvum*)など有用であり得るヒトアジュバントが挙げられる。

【0301】

CVSP14ポリペプチドまたはそのドメイン、誘導体、断片または類似体に対するモノクローナル抗体の作製のためには、連続した培養細胞系による抗体分子の産生を提供するものであればどんな技術を用いてもよい。このような技術として、限定されるものではないが、KohlerおよびMilstein(Nature 256:495-497 (1975))によって最初に開発されたハイブリドーマ技術、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983))、およびヒトモノクローナル抗体を産生するEBVハイブリドーマ技術(Cole et al., in *Monoclonal Antibody and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., p. 77-96 (1985))が挙げられる。さらなる実施形態では、最近の技術を利用して無菌動物でモノクローナル抗体を産生させることができる(PCT/US90/02545)。ヒト抗体も使用でき、これはヒトハイブリドーマを用いることによって(Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030 (1983))、またはin vitroでヒトB細胞をEBVウイルスで形質転換することによって(Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))得られる。CVSP14ポリペプチドに特異的なマウス抗体分子由来の遺伝子を、適当な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子とともにスプライシングすることによる「キメラ抗体」の作製を目的に開発された技術(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985))を用いてもよい。

【0302】

一本鎖抗体の作製に関して記載された技術(米国特許第4,946,778号)を採用してCVSP14ポリペプチド特異的一本鎖抗体を作製することができる。さらなる実施形態では、Fab発現ライプラリーの構築に関して記載された技術(Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989))を用いてCVSP14ポリペプチドまたはそのドメイン、誘導体、または類似体に対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速かつ容易な同定が可能となる。非ヒト抗体は公知の方法によって「ヒト化」することができる(例えば、米国特許第5,225,539号参照)。

【0303】

CVSP14 ポリペプチドまたはそのエピトープと特異的に結合する抗体フラグメントは、当技術分野で公知の技術によって作製することができる。例えば、このような断片としては、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化によって作出可能なF(ab')2断片、F(ab')2断片のジスルフィド橋の還元によって作製できるFab'断片、抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することによって作製できるFab断片、およびFv断片が挙げられる。

【0304】

10

20

30

40

50

抗体の作製において、所望の抗体のスクリーニングは当技術分野で公知の技術、例えば、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)によってなし得る。CVSP14ポリペプチドの特定のドメインに特異的な抗体を選択するには、このようなドメインを含むCVSP14ポリペプチドの断片と結合する産物に対し作製したハイブリドーマをアッセイしてよい。

【0305】

上記の抗体は、例えば診断法における、例えばこれらのタンパク質のイメージング、適当な生理学的サンプル中でのそのレベル測定のための、CVSP14ポリペプチドタンパク質の限局化および/または定量化に関する当技術分野で公知の方法で用いることができる。もう1つの実施形態では、抗CVSP14ポリペプチド抗体またはその結合ドメインを含む断片を治療薬として用いる。

10

【0306】

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、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスまたはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと結合するペプチドミメティクス。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。

20

【0307】

このようなペプチドおよびペプチドミメティクスは哺乳類のCVSP14ポリペプチド活性に関連する疾病または疾患の診断、治療、予防およびスクリーニングに有用である。さらに、このペプチドおよびペプチドミメティクスはCVSP14ポリペプチドの活性を調節する、またはCVSP14ポリペプチドの活性を調節する、あるいはCVSP14ポリペプチド、一般的にはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと特異的に結合する分子または化合物の同定、単離および精製に有用である。分子量の低いペプチドおよびペプチドミメティクスは標的分子、例えばCVSP14ポリペプチドまたはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインに対し強力な結合特性を有し得る。

30

【0308】

本明細書に記載のCVSP14ポリペプチドと結合するペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスはヒトをはじめとする哺乳類に投与してCVSP14ポリペプチド活性を調節することができる。従って、このような活性を調節するに十分な量のペプチド、ポリペプチドまたはペプチドミメティクス化合物を投与することを含む新生物形成疾患の治療法および予防法が提供される。従って、ペプチド、ポリペプチドまたはペプチドミメティクス化合物を治療上有効な量で被験体に投与する、このような疾病または疾患を有する被験体の治療法もまた本明細書で提供される。

40

【0309】

ペプチド、ポリペプチドまたはペプチドミメティクスを含む組成物は予防および/または治療を目的に投与することができる。治療用途では、上記のようにすでに疾病に罹患している患者に対し、病状および合併症を治癒させる、または少なくとも部分的にくい止めるのに十分な量の組成物を投与することができる。この使用に有効な量は疾病の重篤度ならびに患者の体重および全身状態によって異なり、経験によって決定することができる。

【0310】

予防用途では、ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスを含む組成を、特定の疾患に罹患しやすい、あるいはまた特定の疾患のリスクがある患者に投与する。このよ

50

うな量は「予防上有効な量」と定義される。この用法で、正確な量はこの場合もやはり患者の健康状態および体重によって異なる。従って、CVSP14ポリペプチドと結合するこのペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスを用いて有効成分として少なくとも1つのペプチドまたはペプチドミメティクスを医薬担体または希釈剤と会合させて含む医薬組成物を調製することができる。この化合物は、例えば、経口、肺内、非経口(筋肉内、腹腔内、静脈内(IV)または皮下注射)、吸入(微粉末製剤による)、経皮、鼻内、膣、直腸、または舌下の投与経路により投与でき、また、各投与経路に適した投与形に製剤することができる(例えば、PCT国際出願WO 93/25221およびWO 94/17784;ならびに欧州特許出願第613,683号参照)。

【0311】

10

CVSP14ポリペプチドと結合するペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスは、*in vitro*でCVSP14ポリペプチドの産生に影響を与えると思われる、およびCVSP14ポリペプチドの産生によって影響を受けると思われる多くの因子の評価をはじめ、CVSP14ポリペプチドの生物学的な役割を理解する独特的のツールとして有用である。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はまたCVSP14ポリペプチドと結合してその活性を調節するその他の化合物の開発においても、このような化合物はこのような開発を促進すべき構造と活性との間の関係に関する重要な情報をもたらすことから、有用である。

【0312】

20

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はまた、新規なCVSP14ポリペプチドまたはCVSP14ポリペプチドアゴニストのスクリーニングのためのアッセイにおいて競合結合剤としても有用である。このようなアッセイの実施形態では、この化合物は修飾せずに用いることもできるし、あるいは多様な方法、例えば、直接または間接的に検出可能なシグナルを与える部分の共有結合または非共有結合などの標識により修飾することもできる。これらいずれのアッセイにおいても、材料は直接または間接的に標識することができる。直接標識が可能なものとしては、ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼなどの¹²⁵I酵素(米国特許第3,645,090号)のような放射性標識、および蛍光強度、波長シフトまたは蛍光偏光における変化をモニタリングできる蛍光標識(米国特許第3,940,475号)といった標識群が挙げられる。間接標識が可能なものとしては、1つの構成要素をビオチン化した後、上記標識群の1つと共にアビシンと結合させるものが挙げられる。これらの化合物が固相支持体と結合している場合には、これらの化合物はスペーサーまたはリンカーを含んでもよい。

30

【0313】

40

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)、ウエスタンプロット法、ELISAおよびその他の分析プロ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ポリペプチドポリペプチドの精製、またはCVSP14ポリペプチドポリペプチド、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。

【0314】

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はまた種々の医学研究および診断用の商業用試薬としても使用することができる。このペプチドおよびペプチドミメティクスの活性は*in vitro*または*in vivo*のいずれかでMcDonald (1992) Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology, 14:8-21に記載の多数のモデルのうちの1つで評価することができる。

【0315】

50

3. ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクス療法

ペプチド類似体は、鑄型ペプチドのものと特性が類似した非ペプチド薬剤として製薬産業で広く用いられている。この種の非ペプチド系化合物は「ペプチドミメティクス」と呼ばれている(Luthman et al., *A Textbook of Drug Design and Development*, 14:386-406, 2nd Ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:1699-1720; Fauchere (1986) *J. Adv. Drug Res.*, 15:29; Veber and Freidinger (1985) *TINS*, p. 392; およびEvans et al. (1987) *J. Med. Chem.* 30:1229)。治療上有用なペプチドと構造的に類似したペプチドミメティクスを使用して同等または機能の向上した治療または予防効果を生むことができる。ペプチドミメティクスの製法およびその構造は当業者に公知である。

10

【0316】

コンセンサス配列の1以上のアミノ酸の、同型のD-アミノ酸での系統的置換(例えば、L-リジンの代わりにD-リジン)を用いて、より安定なペプチドを作製することができる。さらに、コンセンサス配列または実質的に同一なコンセンサス配列変異体を含む拘束ペプチドは当技術分野で公知の方法(出典明示により本明細書の一部とするRizo et al. (1992) *An. Rev. Biochem.*, 61:387)、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド橋を形成し得る内部システイン残基を付加することで作製することができる。

【0317】

当業者ならば、このペプチドの生物学的または機能的活性に悪影響を与えることなくペプチドおよびミメティクスに修飾を行うことができるのが分かるであろう。さらに、当業者ならば、標的分子、例えばCVSP14ポリペプチドまたは一般的にCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと結合するペプチドを模倣する三次元非ペプチド構造をどのようにデザインすればよいかが分かるであろう(例えば、Eck and Sprang (1989) *J. Biol. Chem.*, 264: 17605-18795参照)。

20

【0318】

診断目的で使用する場合、このペプチドおよびペプチドミメティクスは検出可能な標識で標識することができ、従ってこのような標識のないペプチドおよびペプチドミメティクスは標識したペプチドおよびペプチドミメティクスの作製の中間体として役立ち得る。検出可能な標識は、このペプチドおよびペプチドミメティクスと共有結合している場合、*in vivo*で、例えばこのペプチドおよびペプチドミメティクスを投与した患者で、または*in vitro*で、例えばサンプルまたは細胞で、このペプチドおよびペプチドミメティクスの検出を可能にする分子または化合物であり得る。好適な検出可能な標識は当技術分野で周知であり、例として放射性同位元素、蛍光標識(例えば、フルオレセイン)などが挙げられる。用いられる特定の検出可能な標識は決定的なものではなく、毒性のないレベルで検出可能ないように選択される。このような標識の選択は十分当技術分野の範囲内にある。

30

【0319】

検出可能な標識とこのペプチドおよびペプチドミメティクスとの共有結合は当技術分野で周知の従来の方法によって達成される。例えば、¹²⁵I放射性同位元素を検出可能な標識として用いた場合、¹²⁵Iのペプチドまたはペプチドミメティクスとの共有結合は、アミノ酸チロシンをペプチドまたはペプチドミメティクスに組み込んだ後、ペプチドをヨウ素処理することにより達成することができる(例えば、Weaner et al. (1994) *Synthesis and Applications of Isotopically-labelled Compounds*, pp. 137-140参照)。チロシンがペプチドまたはペプチドミメティクスに存在しない場合、ペプチドまたはペプチドミメティクスのNまたはC末端へのチロシンの組み込みは周知の化学によって達成できる。同様に、³²Pも従来の化学を用い、例えば水酸基を介してリン酸部分としてペプチドまたはペプチドミメティクスへ組み込むことができる。

40

【0320】

ペプチドミメティクスの標識は通常、直接またはスペーサー(例えば、アミド基)を介して1以上の標識を、定量的構造-活性データおよび/または分子モデリングから予測されるペプチドミメティクス上の非干渉位置と共有結合させることを含む。一般にこのような非干

50

涉位置とは、ペプチドミメティクスがそれと結合して治療作用をもたらす高分子と直接接觸しないような位置のことである。ペプチドミメティクスの誘導体化(例えば、標識)は、ペプチドミメティクスの所望の生物活性または薬理活性を実質的に妨害してはならない。

【0321】

CVSP14ポリペプチドまたはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと結合し、かつ/またはその活性を調節する、またはCVSP14ポリペプチド活性を示すペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスは、新生物形成疾患の治療に使用できる。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は、*in vivo*または*ex vivo*で治療の必要な被験体の細胞へ送達することができる。さらに、CVSP14ポリペプチド活性を有するペプチドも*in vivo*または*ex vivo*で突然変異またはCVSP14ポリペプチド遺伝子をコードする対立遺伝子の欠失を有する細胞へ送達することができる。本明細書に記載のまたは当業者に公知の技術のいずれかを、実質的にその他のヒトタンパク質を含まない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の作製および*in vivo*または*ex vivo*での送達に使用できる。例えば、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は微生物での発現または*in vitro*合成により容易に作製できる。

10

【0322】

このペプチドまたはペプチドミメティクスは*in vivo*または*ex vivo*で例えばマイクロインジェクションにより、またはリポソームの使用により細胞へ導入することができる。あるいは、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は能動的にまたは拡散によって*in vivo*または*ex vivo*で細胞に取り込ませることができる。さらに、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の細胞外の用途も新生物形成疾患の治療に十分な効果を与え得る。1)CVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインと結合する;または2)CVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインと類似した機能または活性を有するような薬剤または有機化合物などその他の分子を治療法に用いることができる。

20

【0323】

4. 合理的創薬

合理的創薬の目的は、例えばそのより活性なまたはより安定な形態、または例えば*in vivo*でポリペプチド(例えば、CVSP14ポリペプチド)の機能を増強するまたは妨害する薬剤を創り出すために相互作用する(例えば、アゴニストおよびアンタゴニスト)、目的の生物活性ポリペプチドまたはペプチド、あるいは小分子またはペプチドミメティクスの構造類似体を作製することである。あるアプローチでは、まず、目的タンパク質(例えば、CVSP14ポリペプチドまたはプロテアーゼドメインを有するポリペプチド)の、または例えばCVSP14ポリペプチド-リガンド複合体の三次元構造をX線結晶学によって、コンピューター modelingによって、または最も典型的にはコンビネーションアプローチ(例えば、Erickson et al. 1990参照)によって決定する。また、ポリペプチドの構造に関する有用な情報を相同タンパク質の構造に基づくモデリングによって得ることができる。さらに、アラニンスキヤンによってペプチドを解析することもできる。この技術では、アミノ酸残基をAlaで置換し、ペプチド活性に対する効果を測定する。このペプチドの各々のアミノ酸残基をこの方法で解析してこのペプチドの重要な領域を決定する。

30

【0324】

また、CVSP14ポリペプチド、または一般的にCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと結合するポリペプチドまたはペプチドを機能アッセイによって選択した後、このポリペプチドまたはペプチドの結晶構造を決定することができる。このポリペプチドは、例えば、CVSP14ポリペプチドまたはCVSP14ポリペプチドのタンパク質ドメインに特異的な抗体であり得る。このアプローチから、その後の創薬の基礎となり得るファーマコフォア(薬理的作用団)が得られる。さらに、CVSP14ポリペプチドまたはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインと結合する機能的、薬理活性ポリペプチドまたはペプチドに対し、抗イデオタイプポリペプチドまたはペプチド(抗id)を作製することによって結晶学を迂回することも可能である。鏡像の鏡像として、抗idの結合部位は、本来の標的分子、例えば、CV

40

50

SP14ポリペプチドまたはCVSP14ポリペプチドを有するポリペプチドの類似体であると予想される。次にこの抗idを用いて化学的または生物学的に作製したペプチドバンクのバンクからペプチドを同定および単離することができる。選択されたペプチドは次にファーマコフォアとして役立つ。

【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、これらのことの方法、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ーのおかげで、十分量のCVSP14ポリペプチドポリペプチドを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5および6のアミノ酸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。

【0326】

CVSP14ポリペプチドと結合するペプチドおよびペプチドミメティクスの同定方法
本明細書で提供されるCVSP14ポリペプチドポリペプチド(例えば、CVSP14ポリペプチドまたはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインを有するポリペプチド)に対して結合親和性を有するペプチドは、例えば、親和性増強プロセスと組み合わせたランダムペプチド多様性生成系により容易に同定することができる。具体的には、ランダムペプチド多様性生成系としては、「プラスミド上ペプチド」系(例えば、米国特許第5,270,170号および同第5,338,665号参照);「ファージ上ペプチド」系(例えば、米国特許第6,121,238号およびCwirla, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:6378-6382参照);「ポリソーム系」;「コードされた合成ライブラリー(ESL)」系;および「超大スケール固定化高分子合成」系(例えば、米国特許第6,121,238号;およびDower et al. (1991) An. Rep. Med. Chem. 26:271-280参照)が挙げられる。

【0327】

例えば、上記の手法を用いて、一般に所定数のアミノ酸残基長(例えば、12)を有するようランダムペプチドをデザインすることができる。ランダムペプチドをコードするオリゴヌクレオチドのコレクションを作製するため、コドンモチーフ(NNK)_x(ここで、NはヌクレオチドA、C、GまたはT(等モル;用いる方法論によって、他のヌクレオチドを用いてもよい)であり、KはGまたはT(等モル)であり、かつ、xはペプチド中のアミノ酸の数(例えば、12)に相当する整数である)を用いてNNKモチーフから得られる32の可能性のあるコドン(12のアミノ酸各々に対して1、5のアミノ酸各々に対して2、3のアミノ酸各々に対して3、および3つの停止コドンのうち1つだけ)のうちのどれか1つを具体化することができる。従って、NNKモチーフは全てのアミノ酸をコードし、停止コドンを1つだけコードして、コドンの偏りを少なくする。

【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。

【0329】

10

20

30

40

50

ペプチドおよびペプチドミメティクスの特徴

治療用ペプチド、ポリペプチドおよびペプチドミメティクスの中には約250～約8,000ダルトンの分子量を有するものがある。このようなペプチドを親水性高分子でオリゴマー化、二量体化および/または誘導体化させれば(例えば、化合物の親和性および/または活性を向上させるため)、このようなペプチドの分子量は実質的に増え、約500～約120,000ダルトン、一般には約8,000～約80,000ダルトンの間の範囲であり得る。このようなペプチドには天然アミノ酸または合成(非天然)アミノ酸を9以上含み得る。当業者ならば、治療目的および/または診断目的に適したペプチドおよびペプチドミメティクスの親和性および分子量を決定することができる(例えば、Dower et al., 米国特許第6,121,238号参照)。

【0330】

これらのペプチドは1以上の種々の親水性高分子と共有結合させることができる。好適な親水性高分子としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールを例とするポリアルキルエーテル類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン類、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体が挙げられる。これらのペプチド化合物をこのような高分子で誘導体化する場合、それらの結合活性においてあるとしてもわずかな低下を伴うだけでそれらの溶解度および循環半減期が増加し得る。これらのペプチド化合物は二量体化が可能で、各二量体サブユニットは親水性高分子と共有結合させることができる。これらのペプチド化合物はPEG化、すなわち、ポリエチレングリコール(PEG)と共有結合可能である。

【0331】

5. ペプチドおよびペプチドミメティクスの作製方法

CVSP14ポリペプチドと結合するペプチドは当技術分野で公知の従来技術、例えば、標準的な固相技術を用いて作製することができる。これら標準的方法には全面的固相合成、部分的固相合成法、断片縮合、従来の液相合成、および組換えDNA技術によるものも含まれる(例えば、出典明示により本明細書の一部とするMerrifield (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149参照)。

【0332】

「コードされた合成ライブラリー」または「超大スケール固定化高分子合成」系(例えば、米国特許第5,925,525号および同第5,902,723号参照)を用いて、目的の活性を有する最小サイズのペプチドを割り出すことができる。さらに所望のモチーフ(または最小サイズのそのモチーフ)と1、2またはそれ以上の残基で異なるペプチド群を形成する全てのペプチドを作製することもできる。次にこのペプチドコレクションを、例えば標的分子、CVSP14ポリペプチド、または一般的にはCVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインとの結合能をスクリーニングすることができる。この固定化高分子合成系またはその他のペプチド合成法はまた末端切断類似体および欠失類似体ならびにこれらのペプチド化合物の末端切断および欠失類似体の組合せを合成するためにも使用できる。

【0333】

またこれらの手順を用いて20の天然に存在する、遺伝子コードされたもの以外のアミノ酸がペプチドの1、2またはそれ以上の位置で置換されているペプチドを合成することもできる。例えば、ナフチルアラニンはトリプトファンと置換して合成を促進させることができる。これらのペプチドと置換できるその他の合成アミノ酸としては、L-ヒドロキシプロピル、L-3,4-ジヒドロキシ-フェニルアラニル;L-d-ヒドロキシリシルおよびD-d-メチルアラニルなどのdアミノ酸;L- -メチルアラニル、アミノ酸およびイソキノリルが挙げられる。Dアミノ酸および非天然合成アミノ酸もこれらのペプチドに組み込むことができる(例えば、Roberts et al. (1983) Unusual Amino/Acids in Peptide Synthesis, 5(6):341-449参照)。

【0334】

これらのペプチドはまたリン酸化(例えば、W. Bannwarth et al. (1996) Biorganic and Medicinal Chemistry Letters, 6(17):2141-2146参照)、およびその他のペプチド誘導体

10

20

30

40

50

作製法(例えば、Hruby et al. (1990) *Biochem. J.*, 268(2):249-262参照)によっても修飾することができる。従って、ペプチド化合物もまた同等の生物活性を有するペプチドミメティクスの作製の基礎として役立つ。

【0335】

当業者ならば対応するペプチド化合物として同一または同等の目的生物活性を有するが、溶解度、安定性ならびに加水分解およびタンパク質分解感受性に関してそのペプチドよりも一層好ましい活性を有するペプチドミメティクスを構築するために種々の技術が利用できることが分かるであろう(例えば、Morgan et al. (1989) *An. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252参照)。N末端アミノ基、C末端カルボキシル基で修飾されたペプチドミメティクスを作製し、かつ/またはそのペプチドにおける1以上のアミド結合を非アミド結合に変える方法は当業者に公知である。

10

【0336】

アミノ末端修飾としては、限定されるものではないが、アルキル化、アセチル化およびスクシンイミド基を形成するカルボベンゾイル基の付加(例えば、Murray et al. (1995) *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed., John Wiley and Sons, Inc.参照)が挙げられる。C末端修飾としては、C末端カルボキシル基がエステル、アミドで置換されているか、または環状ペプチドを形成するよう修飾されているミメティクスが含まれる。

【0337】

N末端およびC末端修飾に加え、ペプチドミメティクスをはじめとするペプチド化合物は、1以上の種々の親水性高分子で有利に修飾または共有結合させることができる。ペプチド化合物を親水性高分子で誘導体化すると、それらの結合活性においてあるとしてもわずかな低下を伴うだけで、それらの溶解度および循環半減期を増加させ、かつ、それらの免疫原性がマスキングできることが分かっている。好適な非タンパク質性高分子としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコールを例とするポリアルキルエーテル類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリオキシアルケン類、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、セルロースおよびセルロース誘導体、デキストランおよびデキストラン誘導体が挙げられる。一般的に、このような親水性高分子の平均分子量は約2,000～約40,000ダルトン、および約5,000～約20,000ダルトンなど、約500～約100,000ダルトンの範囲にある。この親水性高分子の平均分子量は約5,000ダルトン、10,000ダルトンおよび20,000ダルトンであってもよい。

20

30

【0338】

ペプチド化合物を誘導体化する、またはペプチドとこのような高分子とを結合させる方法が記載されている(例えば、Zalipsky (1995) *Bioconjugate Chem.*, 6:150-165; Monfardini et al. (1995) *Bioconjugate Chem.*, 6:62-69; 米国特許第4,640,835号; 同第4,496,689号; 同第4,301,144号; 同第4,670,417号; 同第4,791,192号; 同第4,179,337号およびWO 95/34326参照、なおこれらは全て出典明示によりその全内容を本明細書の一部とする)。

【0339】

その他のペプチド誘導体の作製方法は、例えば出典明示により本明細書の一部とするHruby et al. (1990), *Biochem J.*, 268(2):249-262に記載されている。従って、これらのペプチド化合物はまた同等の生物活性を有する非ペプチド化合物の構造モデルとしても役立つ。当業者ならば、特定のペプチド化合物として同一または同等の目的生物活性を有するが、溶解度、安定性、ならびに加水分解およびタンパク質分解感受性に関して一層好ましい活性を有する化合物の構築に種々の技術が利用できることが分かるであろう(例えば、出典明示により本明細書の一部とするMorgan et al. (1989) *An. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252参照)。これらの技術には、ペプチド主鎖の、ホスホネート、アミデート、カルバメート、スルホンアミド、第二級アミン、およびN-メチルアミノ酸からなる主鎖での置換が挙げられる。

40

【0340】

ペプチド化合物は、システインのチオール基間に分子内ジスルフィド結合を有する環化形

50

態で存在し得る。あるいは、二量(またはより高次のオリゴマー)化合物を得るためにシステインのチオール基間の分子内ジスルフィド結合を形成することができる。また、1以上のシステイン残基をホモシステインで置換することもできる。

【0341】

I. コンジュゲート

本明細書では、a)CVSP14ポリペプチドの一本鎖プロテアーゼドメイン(またはそのタンパク質分解活性部分)または全長チモーゲン、その活性型、あるいはその二本鎖または一本鎖プロテアーゼドメイン、およびb)CVSP14ポリペプチドと直接またはリンカーを介して結合しているターゲッティングエージェント(ここで、このエージェントは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、または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容易にする)を含むコンジュゲートが提供される。このコンジュゲートは化学コンジュゲートまたはその融合タンパク質混合物であり得る。

【0342】

ターゲッティングエージェントは、CVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインと直接またはリンカーを介して結合している組織特異的または腫瘍特異的モノクローナル抗体、あるいは増殖因子またはその断片などのタンパク質またはペプチド断片であり得る。ターゲッティングエージェントはまた、タンパク質結合配列、核酸結合配列、脂質結合配列、多糖結合配列、または金属結合配列、あるいは固相支持体と結合するためのリンカーを含むタンパク質またはペプチド断片であり得る。特定の実施形態では、このコンジュゲートはa)本明細書に記載されるようなCVSP14またはその一部、およびb)CVSP14ポリペプチドと直接またはリンカーを介して結合しているターゲッティングエージェントを含む。

【0343】

例えば、CVSP14ポリペプチドドメインのアフィニティー単離または精製、CVSP14ポリペプチドドメインの表面への結合、またはCVSP14ポリペプチドドメインの検出を容易にする働きをするタンパク質またはペプチド断片(またはその複数)を有するCVSP14ポリペプチドの、融合タンパク質および化学コンジュゲートなどのコンジュゲートが提供される。これらのコンジュゲートはチオール結合を介するものなどの化学コンジュゲーションにより作製することができ、また組換え手段によって融合タンパク質として作製することもできる。融合タンパク質においては、このペプチドまたはその断片はCVSP14ポリペプチドドメインのN末端またはC末端のいずれかと結合している。化学コンジュゲートではペプチドまたはその断片はコンジュゲーションがなされる限りいずれの部位にでも結合可能で、単一のCVSP14ポリペプチドドメインまたはその複数と結合されるこのようなペプチドまたは断片は複数であってもよい。

【0344】

ターゲッティングエージェントは細胞または組織へのin vitroまたはin vivo送達を目的としたものであり、細胞または組織特異的抗体、増殖因子および特定の細胞で発現する部分と結合するその他の因子などのエージェント、ならびに結合したタンパク質の方向付けられた送達を促進するその他の細胞または組織特異的エージェントが挙げられる。ターゲッティングエージェントとは細胞表面タンパク質との相互作用およびコンジュゲートまたはそのCVSP14ポリペプチド部分のインターナリゼーションによってCVSP14ポリペプチドを選択された細胞へ特異的に送達するものであり得る。

【0345】

これらのコンジュゲートは種々の方法で用いられ、標的細胞または組織に、またはその近傍に局在している特定のCVSP14による切断に対してタンパク質が細胞傷害性であるプロドラッグなどのプロドラッグの活性化法での使用に特に適している。プロドラッグはコンジュゲートの前、または同時に、あるいはコンジュゲートの後で投与される。標的細胞への送達の際、プロテアーゼはプロドラッグを活性化させ、その後プロドラッグは細胞傷害作用などの治療効果を示す。

【0346】

10

20

30

40

50

1. コンジュゲーション

CVSP14ポリペプチドドメインと結合したコンジュゲートは化学コンジュゲーション、組み換えDNA技術、または組み換え発現および化学コンジュゲーションの組み合わせのいずれの方法でも作製できる。CVSP14ポリペプチドドメインおよびターゲッティングエージェントはどの方向へも結合でき、1以上のターゲッティングエージェントおよび/またはCVSP14ポリペプチドドメインがコンジュゲートに存在可能である。

【0347】

a. 融合タンパク質

本明細書では融合タンパク質が提供される。融合タンパク質には、a)1または複数のCVSP14ポリペプチドドメイン、およびb)ターゲッティングエージェントが含まれる。融合タンパク質は一般に融合タンパク質をコードする核酸の組み換え発現により作出される。

10

【0348】

b. 化学コンジュゲーション

本明細書の化学コンジュゲーションを達成するには、CVSP14ポリペプチドドメインは1以上の選択されたリンカーを介してまたは直接ターゲッティングエージェントと連結させる。標的薬剤が核酸または非ペプチド薬剤などのペプチドまたはタンパク質以外のものである場合には化学コンジュゲーションを用いる必要がある。選択した部分の化学コンジュゲーションのためには当業者に公知のいずれの方法を用いてもよい。

【0349】

2. リンカー

本明細書では2つの目的のためのリンカーが意図される。コンジュゲートにはCVSP14ポリペプチド部分とターゲッティングエージェントとの間に1以上のリンカーを含めることができる。さらに、リンカーはCVSP14ポリペプチドまたはその一部を、ハイスループット固相スクリーニングプロトコールを目的としたものなどマイクロタイタープレート、シリコンもしくはシリコンコートチップ、ガラスまたはプラスチック支持体などの固相支持体に固定化するのを促進または向上させるために用いられる。

20

【0350】

本明細書ではコンジュゲートの作製のための当業者に公知のいずれのリンカーでも使用できる。これらのリンカーは典型的には化学コンジュゲートの作製に用いられ、ペプチドリンカーは融合タンパク質に組み込まれ得る。

30

【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-a-(2-ピリジルジチオ)トルエン、スルホスクシンイミジル-6-[a-メチル-a-(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ッ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。

40

【0352】

その他化学結合コンジュゲートに適したリンカーおよび結合の例としては、限定されるも

50

のではないが、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、障害ジスルフィド結合、およびアミンおよびチオール基など遊離反応基間の共有結合が挙げられる。これらの結合は、ポリペプチドの一方または双方に反応性チオール基を生じるヘテロ二官能性試薬を用いて、反応性マレイミド基またはチオール基が他方に結合可能な反応性チオール基またはアミン基を有するポリペプチド上でチオール基を反応させることによって作出される。その他のリンカーには、ビスマレイミドオトキシプロパン、酸不安定性トランスフェリンコンジュゲートおよびアジピン酸ジヒドラジドなど、より酸度の高い細胞内コンパートメントで切断される酸切断性リンカー;紫外光または可視光に露光した際に切断される架橋リンカーおよびC_H1、C_H2、およびC_H3などヒトIgG₁の不变領域に由来する種々のドメインなどのリンカーが挙げられる(Batra et al. Molecular Immunol., 30:379-386 (1993)参照)。いくつかの実施形態では、各リンカーの所望の特性を利用するためには数種のリンカーを含めることができる。10

【0353】

化学リンカーおよびペプチドリンカーはリンカーと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を共有結合させることによって挿入することができる。以下に記載のヘテロ二官能性試薬を用いてこのような共有結合を達成することができる。またペプチドリンカーをリンカーおよび治療薬(TA)、リンカーおよび標的エージェント、またはリンカー、標的エージェントおよび治療薬(TA)を融合タンパク質としてコードするDNAを発現させることで連結させることもできる。本明細書ではフレキシブルリンカーおよびコンジュゲートの溶解度を高めるリンカーの使用も意図され、単独でまたは他のリンカーとの併用も考えられる。20

【0354】

a) 酸切断性、光切断性および熱感受性リンカー

酸切断性リンカー、光切断性リンカーおよび熱感受性リンカーも、特にCVSP14ポリペプチドのドメインの切断がより容易に反応しやすくするため必要である場合に使用できる。酸切断性リンカーとしては、限定されるものではないが、ビスマレイミドオトキシプロパン;およびアジピン酸ジヒドラジドリンカー(例えば、Fattom et al. (1992) Infection & Immun. 60:584-589参照)および細胞内トランスフェリン循環経路への進入に十分なトランスフェリンの部分を含む酸不安定性トランスフェリンコンジュゲート(例えば、Welchner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:4309-4314参照)が挙げられる。30

【0355】

光切断性リンカーは露光した際に切断されるリンカーであり(例えば、Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-107参照、なおこのリンカーは出典明示により本明細書の一部とする)、その結果、露光時に標的エージェントを放出する。露光時に切断される光切断性リンカーは公知であり(例えば、システインに対する光切断性保護基としてのニトロベンジル基の使用を記載したHazum et al. (1981) in Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110;ヒドロキシプロピルメタクリルアミド共重合体、グリシン共重合体、フルオレセイン共重合体およびメチルローダミン共重合体をはじめとする水溶性光切断性共重合体を記載したYen et al. (1989) Makromol. Chem 190:69-82;近紫外光(350nm)露光時に光分解を受ける架橋リンカーおよび試薬を記載したGoldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104-107;および光切断性結合を生じる塩化ニトロベンジルオキシカルボニル架橋試薬を記載したSenter et al. (1985) Photochem. Photobiol 42:231-237参照)、その結果、露光時に標的エージェントを放出する。このようなリンカーは、光ファイバーを用いて露光できる皮膚科または眼科的条件での治療に特に用途を持つ。コンジュゲートを投与した後に眼または皮膚またはその他の身体部分を露光すればよく、結果としてコンジュゲートから標的部分が放出される。このような光切断性リンカーは、動物の体内から迅速なクリアランスを可能にするべくターゲッティングエージェントを除去することが望ましい診断プロトコールに関して有用である。40

【0356】

b) 化学コンジュゲーションのためのその他のリンカー

10

20

30

40

50

種々の酸度またはアルカリ度の治療薬の放出のために提供するコンジュゲート種を作製するその他のリンカーとしては、トリチルリンカー、特に誘導体化トリチル基が挙げられる。このようにして治療薬が放出されるpH範囲を予め選択できることによってもたらされる柔軟性は、治療薬の送達を必要とする組織間の既知の生理的差異に基づくリンカーの選択を可能にする(例えば、米国特許第5,612,474号参照)。例えば、腫瘍組織の酸度は正常組織のものよりも低いと思われる。

【0357】

c) ペプチドリンカー

リンカー部分はペプチドであってもよい。ペプチドリンカーは融合タンパク質および化学結合コンジュゲートに用いることができる。このペプチドは典型的には約2~約60のアミノ酸残基、例えば約5~約40、または約10~約30のアミノ酸残基を有する。選択される長さは、リンカーが含められる用途などの要因によって異なる。

【0358】

ペプチドリンカーは、ターゲッティングエージェントがタンパク質性のものである場合に有利である。例えば、リンカー部分は一本鎖抗体研究で知られているものなど、柔軟なスペーサーアミノ酸配列であってよい。このような既知のリンカー部分の例としては、限定されるものではないが、 $(\text{Gly}_m\text{Ser})_n$ および $(\text{Ser}_m\text{Gly})_n$ (nは1~6であって、1~4および2~4などであり、mは1~6であって1~4および2~4などである)などのペプチド、酵素切断性リンカーおよびその他のものが挙げられる。

【0359】

さらなる架橋部分は例えば、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883, 1988; Whitlow, M., et al., Protein Engineering 6:989-995, 1993; Newton et al., Biochemistry 35:545-553, 1996; A. J. Cumber et al., Bioconj. Chem. 3:397-401, 1992; Ladurner et al., J. Mol. Biol. 273:330-337, 1997;および米国特許第4,894,443号に記載されている。ある実施形態では、各リンカーの所望の特性を利用するため、数種のリンカーを含めることができる。

【0360】

3. ターゲッティングエージェント

本明細書における使用ではコンジュゲートの検出、固定化または精製を容易にするいずれのエージェントも意図される。化学コンジュゲートについてはこのような特性を持ついずれの部分も意図され、融合タンパク質については、ターゲッティングエージェントは標的とする活性に作用するのに十分なタンパク質、ペプチドまたはその断片である。意図されるターゲッティングエージェントとしてはCVSP14ポリペプチドまたはその部分を選択細胞または組織へ送達するものが挙げられる。このような佐用因子としては、腫瘍特異的モノクローナル抗体およびその部分、FGF、EGF、PDGF、VEGFなどの増殖因子、ケモカインをはじめとするサイトカインおよびその他の作用因子が挙げられる。

【0361】

4. 核酸、プラスミドおよび細胞

融合タンパク質をコードする単離核酸断片が提供される。この融合タンパク質をコードする核酸断片としては、a)CVSP14ポリペプチドのプロテアーゼドメインをコードする核酸；およびb) i)融合タンパク質のアフィニティー単離または精製；ii)融合タンパク質の表面への結合；またはiii)融合タンパク質の検出を容易にするタンパク質、ペプチドまたはその有効な断片をコードする核酸が挙げられる。一般的に、この核酸はDNAである。

【0362】

上記の核酸断片を含む複製用プラスミドおよび発現用ベクターも提供される。これらのプラスミドおよびベクターを含む細胞も提供される。この細胞は、限定されるものではないが、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞および動物細胞をはじめとする、好適な宿主であり得る。この核酸、プラスミド、およびこれらのプラスミドを含む細胞は、本明細書に記載のものをはじめ当技術分野で公知の方法に従って作製できる。

【0363】

10

20

30

40

50

上記融合タンパク質を作製する方法も提供される。方法の例としては、増殖、すなわち融合タンパク質が細胞で発現するような条件下で融合タンパク質をコードするプラスミドを含む細胞を増やすべく細胞を培養し、発現した融合タンパク質を回収するステップを含む。組換えタンパク質の発現および回収方法は当技術分野で周知であり(一般的に、Current Protocols in Molecular Biology (1998) § 16, John Wiley & Sons, Inc.参照)、このような方法を融合タンパク質の発現および回収に用いることができる。

【0364】

回収した融合タンパク質は当技術分野で公知の方法、例えば遠心分離、濾過、クロマトグラフ、電気泳動、免疫沈降など、またはその組合せによって単離または精製することができる(一般に、Current Protocols in Molecular Biology (1998) § 10, John Wiley & Sons, Inc.参照)。一般に、回収した融合タンパク質は、タンパク質または融合タンパク質のペプチド断片とアフィニティー結合部分との間のアフィニティー結合によって単離または精製される。上節で融合タンパク質の構築に関して述べたように、いずれのアフィニティー結合対も構築でき、融合タンパク質の単離または精製に使用できる。例えば、アフィニティー結合対はタンパク質結合配列/タンパク質、DNA結合配列/DNA配列、RNA結合配列/RNA配列、脂質結合配列/脂質、多糖結合配列/多糖、または金属結合配列/金属で得る。

【0365】

5. 固定化およびその支持体

ターゲッティングエージェントが表面との結合を目的にデザインされている特定の実施形態では、CVSP14ポリペプチドはイオン結合または共有結合、非共有結合などの結合によって、あるいはその他の化学的相互作用によって支持体またはマトリックス材料の表面に結合させることができる。固定化は直接またはリンカーを介して行うことができる。CVSP14ポリペプチドは、限定されるものではないが、シリコンチップ、および本明細書に記載され、また当業者に公知であるその他の支持体をはじめとするいずれの好適な支持体にも固定化できる。複数のCVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインは、ハイスループットプロトコールおよび形式で用いるシリコンチップまたはその他のチップの表面上のコンジュゲートのアレイ(すなわち、2以上のパターンのもの)などの支持体と結合させることができる。

【0366】

また、CVSP14ポリペプチドのドメインは、ターゲッティングエージェントがそれに連結していなくても直接またはリンカーを介して表面と結合させることも注目される。よって、CVSP14ポリペプチドのドメインのアレイを含むチップ。

【0367】

本明細書で意図されるマトリックス材料または固相支持体は一般に、リガンドおよびその他の分子を固定化するための当業者に公知のいずれの不溶性材料であってもよく、多くの化学合成および分離で用いられているものである。このような支持体は例えば、アフィニティークロマトグラフィー、生物活性物質の固定化、およびタンパク質、アミノ酸ならびにその他の有機分子および高分子をはじめとする生体分子の化学合成の際に用いられる。支持体の作製および使用は当業者に周知であり、多くのこのような物質およびその作製が知られている。例えば、アガロースおよびセルロースなどの天然支持体材料はそのそれぞれのソースから単離し、既知のプロトコールに従って加工することができるし、合成物質も既知のプロトコールに従って作製することができる。

【0368】

これらの支持体は典型的には固体、多孔質、変形性または硬質の不溶性材料であり、限定されるものではないが、ビーズ、ペレット、ディスク、キャピラリー、中空糸、ニードル、中実ファイバー、ランダム図形、薄膜およびメンブランをはじめとする所望のいずれの構造および幾何学を有するものでもよい。従って、この製品としては、表面の全てまたは一部のコーティングあるいは粒子の含浸によるなど、マトリックス材料から、あるいはそれと合したものから製造できる。

10

20

30

40

50

【0369】

典型的に、マトリックスが粒状である場合、粒子は少なくとも約10~2000μmであるが、選択された用途に応じてそれより小さくても大きくてもよい。マトリックスの選択は、少なくとも1つには、溶解度、官能基、機械的安定性、表面積膨潤性、疎水性または親水性の特性および意図する使用などこれらの物理化学的特性によって決定される。

【0370】

必要であれば、この支持体マトリックス材料は適当な反応性部分を含むよう処理することができる。予め反応性部分を含む支持体マトリックス材料が商業的に入手できる場合もある。これにより、反応性部分を含む支持体マトリックス材料は、分子が結合しているマトリックス支持体として役立ち得る。アミノシラン結合、ヒドロキシル結合またはカルボキシシラン結合などの反応性表面部分を含む材料は、シラン化反応などを含む十分確立された表面化学技術によって製造することができる。これらの材料の例は、-アミノプロピルシランと共有結合した表面酸化珪素部分、およびその他の有機部分、N-[3-(トリエトキシ(ethyoxy)シリル)プロピル]フタラミン酸およびビス-(2-ヒドロキシエチル)アミノプロピルトリエトキシシランを有するものなどである。アミノ基反応性官能基を含む容易に入手できる材料の例としては、限定されるものではないが、パラ-アミノフェニルトリエトキシシランがある。また、誘導体化ポリスチレンおよびその他のこのような高分子は周知であり、当業者であれば容易に入手できる(例えば、多価官能基を有するTentagel(登録商標)樹脂が利用でき、これはRapp Polymere, Tubingen, Germanyから販売されている;米国特許第4,908,405号および同第5,292,814号参照;およびまたButz et al., Pept. Res., 7:20-23 (1994);およびKleine et al., Immunobiol., 190:53-66 (1994)参照)。

10

20

30

40

50

【0371】

これらのマトリックス材料としては、目的分子が結合する支持体マトリックスとして働き得るいすれの材料も含む。このような材料は当業者に公知であり、支持体マトリックスとして用いられるものを含む。このような材料としては、限定されるものではないが、無機物、天然高分子、および、限定されるものではないが、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルとアクリルアミドの共重合体、ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンおよびその他(Merrifield, Biochemistry, 3:1385-1390 (1964)参照)、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレン、デキストラン、ポリアクリルアミド、ゴム、シリコン、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、海綿をはじめとする合成高分子が挙げられる。本明細書で特に注目されるものは、多孔質ガラス(例えば、米国特許第4,244,721号参照)およびホウケイ酸塩、アルコールおよび水を混合して製造されるその他のものである。

【0372】

合成支持体としては、限定されるものではないが、アクリルアミド、デキストラン誘導体およびデキストラン共重合体、アガロースポリアクリルアミド混合物、その他の高分子および種々の官能基との共重合体、メタクリル酸誘導体および共重合体、ポリスチレンおよびポリスチレン共重合体が挙げられる(例えば、Merrifield, Biochemistry, 3:1385-1390 (1964); Berg et al., in Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap., Int. Symp., 1st, Epton, Roger (Ed), pp. 453-459 (1990); Berg et al., Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 20th, Jung, G. et al. (Eds), pp. 196-198 (1989); Berg et al., J. Am. Chem. Soc., 111:8024-8026 (1989); Kent et al., Isr. J. Chem., 17:243-247 (1979); Kent et al., J. Org. Chem., 43:2845-2852 (1978); Mitchell et al., Tetrahedron Lett., 42:3795-3798 (1976);米国特許第4,507,230号;同第4,006,117号;および同第5,389,449号参照)。このような材料としては、ポリビニルアルコール、ポリエチレン-アクリル酸共重合体などのアクリレートおよびアクリル酸、ポリエチレン-メタクリル酸共重合体、ポリエチレン-アクリル酸エチル共重合体、ポリエチレン-アクリル酸メチル共重合体、ポリプロピレン-アクリル酸共重合体、ポリプロピレン-メチル-アクリル酸共重合体、ポリプロピレン-アクリル酸エチル共重合体、ポリプロピレン-アクリル酸メチル共重合体、ポリエチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリプロピレン-酢酸ビニル共重合体などの

高分子および共重合体、ポリエチレン-無水マレイン酸およびポリプロピレン-無水マレイン酸などの酸無水物基を含むものからなるものが挙げられる。またリポソームも固相支持体としてアフィニティー精製に用いられている (Powell et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 33:173 (1989))。

【0373】

タンパク質およびその他の生体分子の固相または液相支持体への固定化に関して多数の方法が開発されている(例えば、Mosbach, *Methods in Enzymology*, 44 (1976); Weetall, *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides*, (1975); Kennedy et al., *Solid Phase Biochemistry, Analytical and Synthetic Aspects*, Scouten, ed., pp. 253-391 (1983)参照; 概要としては、*Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology*, Vol. 34, ed. W. B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. (1974); および *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 42, ed. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. (1974)参照)。

【0374】

最も一般に用いられる方法としては多数のジスルフィド結合、チオエーテル結合、障害ジスルフィド結合、および当業者に公知のアミンおよびチオール基などの遊離反応性基間の共有結合といった、直接もしくはリンカーを介しての支持体への吸収および吸着または共有結合がある(例えば、このような試薬の作製および使用を記載し、このような試薬の商業ソースを示している *the PIERCE CATALOG, ImmunoTechnology Catalog & Hand book*, 1992-1993; Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press (1993)参照; また DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:6909 (1993); Zuckermann et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10646 (1992); Kurth et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994); Ellman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:4708 (1994); Sucholeiki, *Tetrahedron Letts.*, 35:7307 (1994); Su-Sun Wang, *J. Org. Chem.*, 41:3258 (1976); Padwa et al., *J. Org. Chem.*, 41:3550 (1971); および光感受性リンカーを記載している Vedejs et al., *J. Org. Chem.*, 49:575 (1984)参照)。

【0375】

固定化を達成するには、タンパク質またはその他の生体分子を含む組成物をアルミナ、カーボン、イオン交換樹脂、セルロース、ガラスまたはセラミックなどの支持体材料と接触させる。フルオロカーボン高分子が、生体分子が吸着によって結合されている支持体として用いられている(米国特許第3,843,443号; PCT公開国際出願WO/86 03840参照)。

【0376】

J. 予後および診断

CVSP14ポリペプチドタンパク質、そのドメイン、類似体、および誘導体、ならびにコード核酸(およびその相補的な配列)、および抗CVSP14ポリペプチド抗体は診断、特に子宮頸癌、大腸癌または肺腺癌の診断に用いることができる。このような分子は免疫アッセイなどのアッセイで、CVSP14ポリペプチド発現に影響する種々の症状、疾病および疾患の検出、予後、診断またはモニタリング、あるいはその治療のモニタリングに用いることができる。本明細書の目的では体液または腫瘍組織中のCVSP14の存在が特に注目される。

【0377】

特に、このような免疫アッセイは、特異的結合が起こりうる条件下で、患者に由来するサンプルに抗CVSP14ポリペプチド抗体を接触させ、抗体による特異的結合の量を検出または測定することを含む方法によって行われる。組織切片におけるこのような抗体の結合を用いて、異常なCVSP14ポリペプチドの局在または異常なレベルのCVSP14ポリペプチド(例えば、上昇、低下または消失)を検出することができる。特定の実施形態では、CVSP14ポリペプチドに対する抗体を用いて異常なレベルのCVSP14ポリペプチドが病態の指標となる、CVSP14ポリペプチドの存在に関する患者組織または血清サンプルにおいてアッセイすることができる。

【0378】

10

20

30

40

50

使用できる免疫アッセイとしては、限定されるものではないが、ウエスタンプロット、放射性免疫測定法、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降法、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集反応アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定法、蛍光免疫アッセイおよびAタンパク質免疫アッセイなどの技術を用いる競合および非競合アッセイ系が挙げられる。

【0379】

CVSP14ポリペプチド遺伝子および関連する核酸配列ならびに相補配列をはじめとする部分配列もハイブリダイゼーションアッセイに使用できる。CVSP14ポリペプチド核酸配列、または少なくとも約8ヌクレオチド、一般的には14または16または30以上、一般的には1000未満または100までの連続するヌクレオチドを含むその部分配列はハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。ハイブリダイゼーションアッセイは本明細書に記載のCVSP14ポリペプチド発現および/または活性の異常な変化に関連する症状、疾患または疾患の検出、予後、診断またはモニタリングに用いることができる。特に、このようなハイブリダイゼーションアッセイは、ハイブリダイゼーションが起こり得るような条件下で、核酸を含有するサンプルと、CVSP14ポリペプチドをコードするDNAまたはRNAとハイブリダイズ可能な核酸プローブとを接触させ、生じたハイブリダイゼーションを検出または測定する方法によって行う。

【0380】

特定の実施形態では、被験体において異常なレベルのCVSP14ポリペプチドが検出されることを特徴とする疾患または疾患の診断方法が、被験体に由来するサンプル中のCVSP14ポリペプチドのDNA、RNA、タンパク質または機能的活性のレベルを測定することにより本明細書で提供される。この場合、疾患または疾患を持たない類似のサンプルで見られるCVSP14ポリペプチドのDNA、RNA、タンパク質または機能的活性のレベルに対して、CVSP14ポリペプチドのDNA、RNA、タンパク質または機能的活性のレベルにおける上昇または低下はその被験体に疾患または疾患が存在することを示す。

【0381】

1以上の容器に抗CVSP14ポリペプチド抗体、および所望により標識した抗体の結合相手を含む診断用のキットも提供される。あるいは、抗CVSP14ポリペプチド抗体を(検出マーカー、例えば、化学発光部分、酵素部分、蛍光部分または放射性部分で)標識することができる。1以上の容器にSPタンパク質コードRNAとハイブリダイズ可能な核酸プローブを含むキットも提供される。特定の実施形態では、キットは1以上の容器にSPタンパク質コード核酸の少なくとも一部の適当な反応条件下で[例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(例えば、Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA参照)、Q レプリカーゼを利用するリガーゼ連鎖反応(欧州特許EP320,308参照)、環状プローブ反応、または当技術分野で公知のその他の方法によって]増幅誘導可能なプライマー対(例えば、各々6~30ヌクレオチドの範囲の大きさ)を含み得る。キットは所望によりさらに容器内に所定量の精製CVSP14ポリペプチドまたは核酸、例えば標準または対照として用いるものを含むことができる。

【0382】

K. 医薬組成物および投与様式

1. 組成物の成分

本明細書では、CVSP14ポリペプチドの活性を調節すると同定された化合物を含む医薬組成物が提供される。また、CVSP14ポリペプチドの活性を調節する化合物と別の治療または化学療法用化合物などの新生物形成疾患の治療のための化合物との組合せも提供される。

【0383】

CVSP14ポリペプチドモジュレーターおよび抗腫瘍剤は、ともにまたは逐次または断続的投与のための個別の組成物としてパッケージングすることができる。あるいは、これらは単一の投与組成物または単一の組成物としての2つの投与組成物として提供することもできる。組合せもキットとしてパッケージングすることができる。

【0384】

10

20

30

40

50

a. CVSP14ポリペプチド阻害剤

単独または他の化合物と併用した場合に、望ましくない、かつ／または制御できない血管形成を含む新生物形成疾患に関連する臨床徵候または診断マーカーを緩和、軽減、改善、予防または緩解状態にする、もしくは緩解状態で維持し得る、本明細書に記載のものをはじめとするいずれのCVSP14ポリペプチド阻害剤も本組合せで使用できる。

【0385】

ある実施形態では、CVSP14ポリペプチド阻害剤は、CVSP14ポリペプチドまたはそのプロテアーゼドメインと特異的に反応する抗体またはそのフラグメント、CVSP14ポリペプチド産生の阻害剤、CVSP14ポリペプチドの膜局在阻害剤、またはCVSP14ポリペプチドの発現または特にその活性のいずれかの阻害剤である。

10

【0386】

b. 抗血管形成剤および抗腫瘍剤

単独または他の化合物と併用した場合に、望ましくない、かつ／または制御できない血管形成および／または腫瘍増殖ならびに転移、特に固形新生物、先天性血管異常および心血管疾患、慢性炎症性疾患および創傷修復異常、循環器疾患、クレスト症候群、皮膚疾患、または眼疾患に関連する臨床徵候または診断マーカーを緩和、軽減、改善、予防または緩解状態にする、もしくは緩解状態で維持し得る本明細書に記載のものをはじめとするいずれの抗血管形成剤および抗腫瘍剤も本組合せで使用できる。CVSP14ポリペプチドの阻害剤を併用する抗腫瘍剤も意図される。

【0387】

c. 抗腫瘍剤および抗血管形成剤

本明細書で提供される方法によって同定される、または本明細書で提供される化合物は抗腫瘍剤および／または抗血管形成剤と組み合わせて用いることができる。

20

【0388】

2. 製剤および投与経路

本発明の化合物および薬剤は典型的には単位量投与用に医薬組成物として調剤することができる。これら製剤中の化合物の濃度は投与時に意図する治療に有効な量の送達に有効なものである。典型的にはこれらの組成物は単位量投与向けに調剤する。組成物を調剤するには、その重量分の化合物またはその混合物を選択したビヒクルに、治療する症状が軽減または緩和されるような有効濃度で溶解、懸濁、分散させる、あるいはまた混合する。本明細書で提供される化合物の投与に好適な医薬担体またはビヒクルとしては、当業者が特定の投与様式に好適であると承知しているいずれの担体も含む。

30

【0389】

さらに、これらの化合物は組成物中に単独の医薬有効成分として調剤してもよいし、あるいは他の有効成分と組み合わせてもよい。組織ターゲッティングリポソームを含むリポソーム懸濁液も医薬上許容される担体として好適なものであり得る。これらは当業者に公知の方法に従って製造することができる。例えばリポソーム製剤は米国特許第4,522,811号に記載のようにして製造することができる。

【0390】

有効化合物は治療する患者において望ましくない副作用なく治療上有用な作用を発揮するに十分な量で医薬上許容される担体に含める。治療上有効な濃度は本明細書に提供されるアッセイなど、公知の *in vitro* および *in vivo* 系で化合物を試験することにより実験的に決定することができる。

40

【0391】

薬物組成物中の有効化合物の濃度はその有効化合物の吸収率、不活性化率および排出率、化合物の物理化学的特性、投与計画および投与量、ならびに当業者に公知のその他の要因によって異なる。

【0392】

典型的には治療上有効な投与形を考える。投与量は 0.001 ~ 1mg/ml 血液量のオーダーであってよく、例えば約 0.005 ~ 0.05mg/ml および約 0.01mg/ml などである。医薬単位投与形は

50

単位投与形当たり約1mg～約1000mg、例えば約10～500mg、約25～75mgの必須有効成分または必須成分の組合せとなるように製造する。正確な用量は実験的に決定することができる。

【0393】

有効成分は一度に投与してもよいし、あるいはいくつかの少用量に分けて時間をおいて投与してもよい。正確な用量および治療期間は治療する疾病によって異なり、公知の試験プロトコールを用いて実験的に決定することもできるし、あるいはin vivoまたはin vitro試験データから推定することもできると考えられる。濃度または用量の値はまた緩和しようとする症状の重篤度によっても異なり得ることに注意を要する。さらにまた、特定の被験体の特定の投与計画は個々の必要性およびその組成物の投与者または投与管理者の専門的判断に従って経時に調節すべきであり、また、本明細書で示される濃度範囲は単に例であって、請求される組成物またはそれらを含む組合せの範囲または使用を限定するものではない。

【0394】

医薬上許容される誘導体としては酸、塩、エステル、水和物、溶媒和物およびプロドラッグの形態が挙げられる。誘導体は典型的にはその薬物動態特性がそれと対応する中性化合物よりも優れたものとなるように選択する。

【0395】

このように有効濃度または有効量の、本明細書で提供される1以上の化合物またはその医薬上許容される誘導体を全身投与、局所投与または局部投与に好適な医薬担体またはビヒクルと混合して医薬組成物とする。化合物は治療を意図する疾患を緩和または治療するのに有効な量で含む。組成物中の有効化合物の濃度は有効化合物の吸収率、不活性化率、排出率、投与計画、投与量、特定の剤形、ならびに当業者に公知のその他の要因によって異なる。

【0396】

非経口、皮内、皮下、または局所適用に用いる溶液または懸濁液としては以下の成分：注射水、生理食塩水、硬化油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコールおよびメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸および重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸(EDTA)などのキレート剤；酢酸、クエン酸およびリン酸などのバッファー；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張力調整剤のいずれかを含んでよい。非経口製剤はガラス製、プラスチック製またはその他好適な材質のアンプル、使い捨てシリンジ、または一回量または複数量バイアルに封入することができる。

【0397】

化合物が十分な溶解度を示さない場合は化合物を可溶化する方法を使用することができる。このような方法は当業者に公知であり、限定されるものではないが、ジメチルスルホキシド(DMSO)などの補助溶媒の使用、Tween(登録商標)などの界面活性剤の使用、または重炭酸ナトリウム水溶液への溶解などが挙げられる。有効な医薬組成物の調剤にはまた、化合物のプロドラッグなど化合物の誘導体を使用することもできる。眼科適用としては、眼科上許容される担体中に組成物を調剤する。本明細書での眼用としては、局所投与または注射いずれかによる局所投与が考えられる。徐放性製剤も望ましい。典型的にはこれらの組成物は一回量で有効量を投与するような単位量投与用に調剤する。

【0398】

化合物にビヒクルを混合または添加した際、得られる混合物は溶液、懸濁液、エマルションまたはその他の組成物となり得る。得られる混合物の形態は意図する投与様式、選択した担体またはビヒクルでの化合物の溶解度をはじめ、いくつかの要因によって異なる。必要であればこれら化合物の医薬上許容される塩または他の誘導体を製造する。

【0399】

これら化合物は医薬上許容される担体中に、治療する患者に望ましくない副作用なく治療上有用な作用を発揮するに十分な量で含める。副作用の数および程度は化合物を投与する

10

20

30

40

50

症状によって異なると考えられる。例えば、ある特定の毒性作用および望ましくない副作用は、命に関わる疾病を治療する場合には許容されるが、そうでもない疾患を治療する場合には許容されないことがある。

【0400】

またこれらの化合物は、所望の作用を損なうことのない他の有効物質と混合することもできるし、あるいは当業者に公知の所望の作用を補う物質と混合することもできる。本明細書で用いられるこれらの化合物および薬剤の製剤としては、経口投与、直腸投与、局所投与、吸入、口内(例えば舌下)投与、非経口投与(例えば皮下、筋肉内、皮内または静脈投与)、経皮投与またはいずれかの経路に好適なものが挙げられる。あるケースでの最も好適な経路は治療する症状の性質および重篤度、ならびに用いる特定の有効化合物の性質によって異なる。これらの製剤は、好適量の化合物またはその医薬上許容される誘導体を含有する錠剤、カプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、滅菌非経口溶液または懸濁液、および経口溶液または懸濁液、ならびに水中油エマルションなどの単位投与形でヒトおよび動物への投与向けに提供される。医薬上治療上有効な化合物およびその誘導体は典型的には単位投与形または複数投与形で調剤し、投与する。本明細書において単位投与形とは、ヒトおよび動物被験体に適した物理的に別個の単位をさし、当技術分野で公知のように個別包装されている。各単位量は所望の治療作用をもたらすに十分な所定量の治療上有効な化合物を必要とされる医薬担体、ビヒクルまたは希釈剤と組み合わせて含有する。単位投与形の例としてはアンプルおよびシリングならびに個別包装された錠剤またはカプセル剤が挙げられる。単位投与形はその一部、または複数を投与することができる。複数投与形は分離された単位投与形で投与されるように单一の容器に包装された複数の同一単位投与形である。複数投与形の例としてはバイアル、錠剤もしくはカプセル剤瓶、またはパイントもしくはガロン瓶が挙げられる。この場合、複数投与形は包装上分離できない複数の単位投与形である。

【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、アカシアゼラチンガムなどの天然ガム、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。

【0402】

0.005%~100%の範囲の有効成分を含有し、残部は無毒な担体からなる投与形または組成物を製造することができる。経口投与には、これらの医薬組成物は、結合剤(例えば、アルファー化コーンスター、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース);增量剤(例えば、ラクトース、微晶質セルロースまたはリン酸水素カルシウム);滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ);崩壊剤(例えば、ポテスター、またはグリコール酸ナトリウムデンプン);または湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)などの医薬上許容される賦形剤を用いて常法により製造される例えば錠剤またはカプセル剤の形態をとってもよい。錠剤は当技術分野で周知の方法によりコーティ

10

20

30

40

50

ングしてもよい。

【0403】

医薬製剤はまた例えば溶液、シロップ、または懸濁液などの液体であってもよく、あるいは水またはその他好適なビヒクルで使用前に再構成する薬物製品として提供することもできる。このような液体製剤は、沈殿防止剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用油脂);乳化剤(例えば、レシチンまたはアラビアガム);非水性ビヒクル(例えば、アーモンド油、油性エステル、または精留植物油);および保存剤(例えば、メチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエート、またはソルビン酸)などの医薬上許容される添加剤を用い、常法により製造することができる。

【0404】

直腸投与に好適な製剤は単位投与坐剤として提供することができる。これらは有効化合物を1以上の通常の固形担体、例えばカカオ脂と混合した後、得られた混合物を成形することにより製造することができる。

【0405】

皮膚または眼への局所適用に好適な製剤としては一般に軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゲル、スプレー、エアーゾル、およびオイルとして調剤する。使用可能な担体としてはワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、アルコール、およびそれらの2以上の組合せが挙げられる。さらに局所製剤はヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリ(アルキレングリコール)、ポリヒドロキシアルキル、メタクリーレートまたはポリメタクリルアミドから選択される増粘剤を0.05~15重量%含むことが有利であり得る。局所製剤は多くの場合滴下により、あるいは結膜嚢への軟膏として適用する。またこれは眼、顔面の凹部および外耳道の洗浄または潤滑のためにも使用できる。また、前眼房その他の場所に注入することもできる。液体状の局所製剤は有効成分が放出するストリップ、コンタクトレンズなどの形態の親水性三次元高分子マトリックスとして提供することができる。

【0406】

吸入による投与としては、本明細書で用いる化合物は、好適な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素またはその他の好適なガスを用いて加圧パックまたはネブライザーから提供されるエアーゾルスプレーの形態で送達することができる。加圧エアーゾルの場合、投与単位は計量された量を送達するバルブを設けることで定量することができる。吸入または通気で用いるための例えばゼラチンのカプセルまたはカートリッジは化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含むよう配合することができる。

【0407】

口内(舌下)投与に好適な製剤としては例えば香味基剤、通常はスクロースおよびアラビアガムまたはトラガカントガム中に有効化合物を含むトローチ剤、およびゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアラビアガムなどの不活性基剤中に化合物を含む香錠が挙げられる。

【0408】

これらの化合物は注射、例えばボーラス注射または点滴による非経口投与用に調剤することができる。注射用製剤は単位投与形、例えばアンプル、または保存剤を添加して複数用量容器で提供することができる。これらの組成物は油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルションであってもよく、沈殿防止剤、安定剤および/または分散剤などの配合剤を含んでもよい。あるいは有効成分は使用前に好適なビヒクル、例えば滅菌バイロジエンフリー水またはその他の溶媒で再構成する粉末状としてもよい。

【0409】

経皮投与に好適な製剤は長時間レシピエントの表皮との緊密な接触を保つようにした個別パッチとして提供することができる。このようなパッチは有効化合物を、例えば有効化合物に対して0.1~0.2M濃度の、所望により緩衝させた水溶液として適宜含む。経皮投与に好適な製剤はまたイオン導入法によって送達することもでき(例えば、Pharmaceutical Re

10

20

30

40

50

search 3 (6), 318 (1986)参照)、典型的には所望により緩衝させた有効化合物の水溶液の形態をとる。

【0410】

これらの医薬組成物はまた徐放性手段および/または徐放性送達ディバイスによって投与することもできる(例えば、米国特許第3,536,809号;第3,598,123号;第3,630,200号;第3,845,770号;第3,847,770号;第3,916,899号;第4,008,719号;第4,687,610号;第4,769,027号;第5,059,595号;第5,073,543号;第5,120,548号;第5,354,566号;第5,591,767号;第5,639,476号;第5,674,533号および第5,733,566号参照)。

【0411】

望ましい血液レベルは血漿レベルにより確認されるので有効剤の点滴により維持することができる。主治医ならばいつどのように治療を終了、中断すればよいか、あるいは毒性、または骨髄不全、肝不全もしくは腎不全により低用量に治療を調節すればよいかが分かることを注記しておく。逆に主治医ならば臨床応答が十分でない(有害な副作用を除く)場合に、いつどのように治療を高用量に調節すればよいかも分かるであろう。

【0412】

また、CVSP14ポリペプチド阻害剤単独または他の薬剤との併用における効力および/または毒性も当技術分野で公知の方法によって評価することができる(一般に、O'Reilly, Investigational New Drugs, 15:5-13 (1997)参照)。

【0413】

有効化合物または医薬上許容される誘導体は徐放性製剤またはコーティングなど、化合物がその本体から急速に放出されるのを防ぐ担体を用いて製造することができる。

【0414】

これらの組成物および/または組合せをその投与に関する説明書とともに含むキットも提供される。このキットはさらに、典型的には無菌形態で包装された、複合体を注射するための針またはシリンジおよび/または包装されたアルコールパッドを含んでもよい。説明書は所望により医師または患者による有効剤の投与のために含める。

【0415】

最後にこれらの化合物またはCVSP14ポリペプチドもしくはそのプロテアーゼドメイン、または上記薬剤のいずれかを含有する組成物は包装材料、その包装材料の中に本明細書で意図される疾病または疾患の治療に有効な本明細書で提供される化合物またはその好適な誘導体、および化合物またはその好適な誘導体が本明細書で意図される疾病または疾患の治療用のものであることを示すラベルを含む製品としてパッケージングすることができる。ラベルには本治療が保証される疾患を記載することができる。

【0416】

L. 治療方法

本明細書の方法によって同定される化合物は動物、特にヒトをはじめとする哺乳類における新生物形成疾患を治療または予防するために用いられる。ある実施形態では、本方法は有効量のCVSP14ポリペプチド阻害剤を哺乳類に投与し、それにより疾病または疾患を治療または予防することを含む。

【0417】

ある実施形態では、治療または予防に用いられるCVSP14ポリペプチド阻害剤は医薬上許容される担体または賦形剤とともに投与する。治療する哺乳類はヒトであり得る。本明細書で提供される阻害剤はスクリーニングアッセイによって同定されるものである。さらにまた、抗体およびアンチセンス核酸またはRNAiなどの二本鎖RNA(dsRNA)も意図される。

【0418】

この治療または予防方法はさらに、CVSP14ポリペプチド阻害剤(これはCVSP14ポリペプチドの活性を阻害することが確認されているいずれの化合物であってもよい)と同時、またはその前、またはその後に抗血管形成治療もしくは抗血管形成剤または抗腫瘍剤を投与することを含み得る。このような化合物としては小分子モジュレーター、CVSP14ポリペプチドに対する抗体またはその結合領域を含むその断片もしくは誘導体、CVSP14ポリペプチド

10

20

30

40

50

をコードするアンチセンス核酸またはRNAiなどの二本鎖RNA(dsRNA)、ならびに異種ヌクレオチド配列が、その異種配列がCVSP14ポリペプチドをコードする遺伝子の少なくとも一部の生物活性を不活性化するように挿入されているCVSP14ポリペプチドをコードする遺伝子の少なくとも一部を含む核酸(ここで、このCVSP14ポリペプチドをコードする遺伝子の一部は、CVSP14ポリペプチドをコードするゲノム遺伝子との相同組換えを促進するように異種配列をフランкиングしている)が挙げられる。また、このような分子は一般に約1000nt未満の長さである。

【0419】

1. アンチセンス治療

ある特定の実施形態では、以上に示したように、新生物形成疾患を治療または予防するためにCVSP14ポリペプチドアンチセンス核酸によってCVSP14ポリペプチド機能を低下させる、または阻害する。CVSP14ポリペプチドまたはその一部をコードする遺伝子またはcDNAに対してアンチセンスである少なくとも6ヌクレオチドの核酸の治療的または予防的使用。本明細書においてCVSP14ポリペプチド「アンチセンス」核酸とは、いくらかの配列相同性のためにCVSP14ポリペプチドRNA(一般にmRNA)の一部と、一般に高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸をさす。このアンチセンス核酸はCVSP14ポリペプチドmRNAのコードおよび/または非コード領域に相補的なものであり得る。このようなアンチセンス核酸はCVSP14ポリペプチド機能を低下または阻害する治療薬としての用途を有し、上記のような疾患の治療または予防に使用できる。

【0420】

CVSP14ポリペプチドアンチセンス核酸は少なくとも6ヌクレオチドのものであり、一般にオリゴヌクレオチド(6~50ヌクレオチドなど、6~約150ヌクレオチドの範囲)である。このアンチセンス分子はプロテアーゼドメインの全部または一部に相補的なものであり得る。例えばこの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15ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、または少なくとも125ヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドはDNAまたはRNAまたはキメラ混合物またはその誘導体もしくは変形体、一本鎖または二本鎖であり得る。このオリゴヌクレオチドは塩基部分、糖部分、またはリソ酸骨格で変形することができる。このオリゴヌクレオチドはペプチドまたは細胞膜(例えば、Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556 (1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:648-652 (1987); 1988年12月15日公開のPCT公報WO 88/09810参照)または血液脳関門(例えば、1988年4月25日公開のPCT公報WO 89/10134参照)をわたる輸送を促進する薬剤、ハイブリダイゼーション誘発型切断剤(例えば、Krol et al., BioTechniques 6:958-976 (1988)参照)またはインターラーコンジション剤(例えば、Zon, Pharm. Res. 5:539-549 (1988)参照)などの他の補助基を含んでもよい。

【0421】

CVSP14ポリペプチドアンチセンス核酸は一般にオリゴヌクレオチド、典型的には一本鎖DNAもしくはRNAまたはその類似体もしくはその混合物である。例えばオリゴヌクレオチドとしてはヒトCVSP14ポリペプチドの一部に対してアンチセンスである配列が挙げられる。このオリゴヌクレオチドは当技術分野で一般に知られている置換基でその構造上のいずれかの部分で変形することができる。

【0422】

CVSP14ポリペプチドアンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されるものではないが、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキュー-オシン、イノシン、N6-イソペニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキュー-オシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキ

10

20

30

40

50

シウラシル、2-メチルチオ-N6-イソベンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリンからなる群から選択される少なくとも1つの改変塩基部分を含み得る。

【0423】

もう1つの実施形態では、このオリゴヌクレオチドは、限定されるものではないが、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシリロースおよびヘキソースからなる群から選択される少なくとも1つの改変糖部分を含む。このオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート、ホスオロジチオエート、ホスホルミドチオエート、ホスホルアミデート、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタールまたはその類似体から選択される少なくとも1つの改変リン酸骨格を含み得る。

【0424】

このオリゴヌクレオチドは-アノマー型オリゴヌクレオチドであってもよい。-アノマー型オリゴヌクレオチドは相補的RNAと、両鎖が互いに平行に走る特異的二本鎖ハイブリッドを形成する(Gautier et al., *Nucl. Acids Res.* 15:6625-6641 (1987))。

【0425】

このオリゴヌクレオチドは別の分子、例えばペプチド、ハイブリダイゼーション誘発型架橋剤、輸送剤およびハイブリダイゼーション誘発型切断剤とコンジュゲートさせることができる。

【0426】

これらのオリゴヌクレオチドは当技術分野で公知の標準的な方法により、例えば自動DNAシンセサイザー(Bioscience, Applied Biosystemsから市販されているものなど)を用いることで合成することができる。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドはStein et al. (*Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988))の方法により合成することができ、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは細孔性ガラス(controlled pore glass)支持体などを用いて作製することができる(Sarin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451 (1988))。

【0427】

ある特定の実施形態では、CVSP14ポリペプチドアンチセンスオリゴヌクレオチドは触媒RNAまたはリボザイムを含む(例えば、1990年10月4日公開のPCT国際公報WO 90/11364; Sarver et al., *Science* 247:1222-1225 (1990)参照)。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは2'-0-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148 (1987))、またはキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al., *FEBS Lett.* 215:327-330 (1987))である。あるいはこのオリゴヌクレオチドはRNAiなどの二本鎖RNA(dsRNA)であってもよい。

【0428】

もう1つの実施形態では、CVSP14ポリペプチドアンチセンス核酸は外来配列からの転写により細胞内で産生させる。例えば、ベクターを、細胞に取り込まれ、その細胞内でベクターまたはその一部が転写され、アンチセンス核酸(RNA)を产生するようにin vivoに導入することができる。このようなベクターはCVSP14ポリペプチドアンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターはそれが転写されて目的のアンチセンスRNAを产生する限り、エピソームに留まつても染色体に組み込まれてもよい。このようなベクターは当技術分野で標準的な組換えDNA技術によって構築することができる。ベクターはプラスミド、ウイルス、または哺乳類細胞での複製および発現に用いられる当技術分野で公知のその他のものであってもよい。CVSP14ポリペプチドアンチセンスRNAをコードする配列の発現はヒトをはじめとする哺乳類細胞で作用することが当技術分野で知られているいずれのプロモーターによるものであってもよい。このようなプロモーターは誘導型のものであっても構成型のものであってもよい。このようなプロモーターとしては、限定されるものではないが、SV40初期プロモーター領域(Berkoist and Chambon, *Nature* 290:304-310 (1985))を用いる。

10

20

30

40

50

1)、ラウス肉腫ウイルスの3'長い末端反復に含まれるプロモーター(Yamamoto et al., Cell 22:787-797 (1980)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445 (1981)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinstler et al., Nature 296:39-42 (1982)などが挙げられる。

【0429】

これらのアンチセンス核酸はヒトCVSP14ポリペプチド遺伝子をはじめとする、CVSP14ポリペプチド遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部と相補的な配列を含む。絶対的な相補性の必要はない。

【0430】

新生物形成疾患の治療または予防に効果的なCVSP14ポリペプチドアンチセンス核酸(dsRNA)の量は疾病の性質によって異なり、標準的な臨床技術によって実験的に決定することができる。可能であれば、アンチセンス細胞傷害性は *in vitro*で調べた後、ヒトでの試験および使用に先立ち有用な動物モデル系で調べることが望ましい。

【0431】

2. RNA干渉

CVSP14をコードする遺伝子の発現を阻害するため、RNA干渉(RNAi)(例えば、Chuang et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:4985参照)を用いることができる。干渉RNA(RNAi)断片、特に二本鎖(ds)RNAiは、CVSP14機能の欠損を作り出すために使用できる。哺乳類、C.エレガンス、ショウジョウバエ(Drosophila)および植物ならびにヒトをはじめとする生物において遺伝子をサイレンシングするためのRNAiの使用に関する方法が知られている(例えば、Fire et al. (1998) Nature 391:806-811 Fire (1999) Trends Genet. 15:358-363; Sharp (2001) Genes Dev. 15:485-490; Hammond, et al. (2001) Nature Rev. Genet. 2:110-1119; Tuschl (2001) Chem. Biochem. 2:239-245; Hamilton et al. (1999) Science 286:950-952; Hammond et al. (2000) Nature 404:293-296; Zamore et al. (2000) Cell 101:25-33; Bernstein et al. (2001) Nature 409: 363-366; Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15:188-200; Elbashir et al. (2001) Nature 411:494-498;国際PCT出願WO 01/29058;国際PCT出願WO 99/32619参照)。二本鎖RNA(dsRNA)を発現する構築物はエピソームに留まる、またはゲノムに組み込まれる複製ベクターを用いて動物または植物などの宿主へ導入する。適当な配列を選択することで、dsRNAの発現はCVSP14をコードする内在mRNAの蓄積により干渉され得る。RNAiはまた *in vitro*で発現を阻害するために使用することもできる。領域はCVSP14に対して選択性のある(すなわち、特有の)少なくとも約21(または21)のヌクレオチドを含み、これをRNAiの作製に用いる。約21ヌクレオチドのより短い断片は直接細胞へ形質転換でき、より大きなRNAi dsRNA分子は一般にそれらをコードするベクターを用いて導入する。dsRNA分子は少なくとも約21bp以上の長さ、例えば50、100、150、200およびそれ以上である。

【0432】

3. 遺伝子治療

ある例としての実施形態では、遺伝子治療によってCVSP14ポリペプチドの機能を増強するため、CVSP14ポリペプチドまたはその機能的ドメインもしくは誘導体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を投与する。遺伝子治療とは被験体に核酸を投与することによって行う治療をさす。この実施形態では核酸はそこにコードされている、CVSP14ポリペプチドの機能を増強することにより治療作用を媒介するタンパク質を産生する。当技術分野で利用できる遺伝子治療の方法はいずれでも使用できる(Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, An. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993);およびMorgan and Anderson, An. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIBTECH 11(5):155-215 (1993)参照)。

【0433】

例えば、遺伝子治療用の治療組成物としては、好適な宿主内でCVSP14ポリペプチドまたはそのドメイン、断片もしくはキメラタンパク質を発現する発現ベクターの一部としてのCV

10

20

30

40

50

SP14ポリペプチドをコードする核酸を含む。特にこのような核酸は作動可能なようにCVSP14ポリペプチドコード領域に連結されたプロモーターを有し、このプロモーターは誘導型のものでも構成型のものでも、所望により組織特異的なものであってもよい。もう1つの特定の実施形態では、CVSP14ポリペプチドコード配列および他のいすれかの所望の配列がゲノム中の望ましい部位で相同組換えを促進する領域でフランкиングされている核酸分子を用いることで、SPタンパク質核酸の染色体内発現をもたらす(Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989))。

【0434】

患者への核酸送達は、患者がその核酸または核酸保持ベクターに直接曝される直接的なものであっても、あるいはまずin vitroで細胞をその核酸で形質転換した後、患者に移植する間接的なものであってもよい。これらの2つのアプローチはそれぞれin vivoまたはex vivo遺伝子治療として知られている。

【0435】

ある特定の実施形態では、核酸を直接in vivo投与し、そこで発現させてコードされている産物を産生させる。これは例えばそれを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、例えば欠陥または弱毒レトロウイルスまたはその他のウイルスベクターを用いて感染させることにより(米国特許第4,980,286号参照)、あるいは裸のDNAの直接注入により、あるいは微粒子衝撃(例えば、遺伝子ガン； Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクション剤でのコーティング、リポソーム、微粒子もしくはマイクロカプセル封入の使用により、あるいは核に入ることが知られているペプチドと結合させて投与することにより、あるいはレセプターを媒介とするエンドサイトーシスを受けるリガンドと結合させて投与することによるなど(例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)参照)(これはそのレセプターを特異的に発現する細胞種をターゲッティングするために使用できる)、それが細胞内に存在するように投与することによる、当技術分野で知られている多くの方法のいすれかにより達成することができる。もう1つの実施形態では、リガンドがエンドソームを破壊して核酸にリソソーム分解を避けさせるための融合誘導性ウイルスペプチドである場合の核酸-リガンド複合体を形成させることができる。なおもう1つの実施形態では、特異的レセプターをターゲッティングすることで、核酸をin vivoにおいて細胞特異的取り込みおよび発現にターゲッティングすることができる(例えば、1992年4月16日付けのPCT公報WO 92/06180(Wu et al.); 1992年1月23日付けのWO 92/22635(Wilson et al.); 1992年11月26日付けのWO 92/20316(Findeis et al.); 1993年7月22日付けのWO 93/14188(Clarke et al.); 1993年10月14日付けのWO 93/20221(Young)参照)。あるいは、核酸は細胞内に導入し、相同組換えにより発現のため宿主細胞のDNAに組み込むことができる(Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989))。

【0436】

ある特定の実施形態では、CVSP14ポリペプチド核酸を含むウイルスベクターを用いる。例えばレトロウイルスベクターが使用できる(Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993))。これらのレトロウイルスベクターはウイルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みに必要でないレトロウイルス配列を欠くよう改変したものである。遺伝子治療に用いるCVSP14ポリペプチド核酸は患者への遺伝子送達を助けるベクターへクローニングする。レトロウイルスベクターに関してさらに詳しいことは、幹細胞の放射線療法耐性を高めるために造血幹細胞へmdr1遺伝子を送達することを目的としたレトロウイルスベクターの使用について記載したBoesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)に見出せる。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を示したその他の参考文献としては、Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); およびGrossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)がある。

10

20

30

40

50

【0437】

アデノウイルスは遺伝子治療に使用できるもう1つのウイルスベクターである。アデノウイルスは呼吸器上皮に遺伝子を送達するのに特に魅力的な伝達体である。アデノウイルスは呼吸器上皮に自然感染し、そこで軽い疾病を引き起こす。アデノウイルス送達系の他の標的としては肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉がある。アデノウイルスは非分裂細胞に感染し得るという利点を持つ。Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993)はアデノウイルスに基づく遺伝子治療の総説を記している。Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994)では、アカゲザルの呼吸器上皮へ遺伝子を送達することを目的としたアデノウイルスベクターの使用を示している。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の事例はRosenfeld et al., *Science* 252:43 10 1-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); およびMastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993)で見出せる。

【0438】

アデノ随伴ウイルス(AAV)も遺伝子治療での使用のために提案されている(Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993))。

【0439】

遺伝子治療のもう1つのアプローチとしては、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを媒介とするトランスフェクション、またはウイルス感染などの方法により遺伝子組織培養細胞へ導入することを含む。通常、導入方法は細胞に選択マーカーを導入することを含む。次にこれらの細胞を、導入された遺伝子を取り込んで発現する細胞を単離するための選択下に置く。このような細胞を次に患者へ送達する。 20

【0440】

この実施形態では、核酸は予め細胞へ導入し、結果として生じた組換え細胞を *in vivo* 投与する。このような導入は、限定されるものではないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、その核酸配列を含むウイルスまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子導入、マイクロセル媒介遺伝子導入、スフェロプラスト融合などをはじめ、当技術分野で公知のいずれかの方法によって行うことができる。当技術分野では外来遺伝子を細胞へ導入するための多くの技術が知られており(例えば、Loeffler and Behr, *Meth. Enzymol.* 217:599-618 (1993); Cohen et al., *Meth. Enzymol.* 217:618-644 (1993); Cline, *Pharmac. Ther.* 29:69-92 (1985)参照)、レシピエント細胞の必要な発達機能および生理機能が壊れない限り使用することができる。これらの技術は細胞へ核酸を、その核酸が細胞により発現され、かつ、一般には遺伝してその細胞の後代によっても発現可能なように安定して導入されるものでなければならない。 30

【0441】

得られた組換え細胞は当業者で公知の種々の方法によって患者へ送達することができる。ある実施形態では、上皮細胞が例えば皮下注射される。別の実施形態では、組換え皮膚細胞を患者への皮膚移植片とすることができる。組換え血液細胞(例えば造血幹細胞または始原細胞)は静脈投与することができる。想定される細胞の使用量は望む作用、患者の状態などによって異なり、当業者ならば決定することができる。 40

【0442】

遺伝子治療の目的で核酸を導入し得る細胞としては、所望の利用可能ないずれの細胞種も含み、限定されるものではないが、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、纖維芽細胞、筋細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞; 種々の幹細胞または始原細胞、特に造血幹細胞または始原細胞、例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓およびその他その他の供給源から得た幹細胞が挙げられる。

【0443】

例えば遺伝子治療に用いる細胞は患者自己のものである。遺伝子治療において組換え細胞を用いるある実施形態では、CVSP14ポリペプチド核酸を、それが細胞またはそれらの後代

10

30

40

50

により発現され得るように細胞へ導入した後、これらの組換え細胞を治療効果を求めて *in vivo* 投与する。特定の実施形態では幹細胞または始原細胞を用いる。単離して *in vitro* で維持可能ないずれの幹細胞および / または始原細胞でも本実施形態に従って使用できる可能性がある。このような幹細胞としては、限定されるものではないが、造血幹細胞 (HSC)、皮膚および消化管の内層などの上皮組織の幹細胞、胎児心筋細胞、肝臓幹細胞 (1994年4月28日付けのPCT公報WO 94/08598)、および神経幹細胞 (Stemple and Anderson, *Cell* 71: 973-985 (1992)) が挙げられる。

【 0 4 4 4 】

上皮幹細胞 (ESC) またはケラチノサイトは公知の方法により皮膚および消化管の内層などの組織から得ることができる (Rheinwald, *Meth. Cell Bio.* 21A:229 (1980))。皮膚などの層状上皮組織では、基底板に最も近い層である胚層内の細胞の有糸分裂により再生が起こっている。消化管内層内の幹細胞はこの組織の急速な再生速度をもたらす。患者またはドナーの皮膚または消化管の内層から得た ESC またはケラチノサイトは組織培養で増殖させることができる (Rheinwald, *Meth. Cell Bio.* 21A:229 (1980); Pittelkow and Scott, *Cancer Clinic Proc.* 61:771 (1986))。ドナーから ESC が提供されれば、宿主対移植片反応性の抑制方法 (例えば、適度な免疫抑制を促進するための照射、薬物または抗体投与) も使用できる。

【 0 4 4 5 】

この実施形態では、造血幹細胞 (HSC) に関しては HSC の単離、増殖および *in vitro* 維持を可能とする技術が使用できる。これを達成し得る技術には、(a) 将来の宿主またはドナーから単離した骨髄細胞からの HSC の単離およびその培養系の確立、または (b) 同種のものでも異種のものであってもよいが、予め確立された HSC の長期培養系の使用が含まれる。一般に将来の宿主 / 患者の移植免疫反応を抑制する方法では非自己 HSC が用いられる。特定の実施形態では、ヒト骨髄細胞は後腸骨稜から穿刺吸引によって得ることができる (例えば、Kodo et al., *J. Clin. Invest.* 73:1377-1384 (1984) 参照)。例えば、HSC は高濃縮物または実質的に純粋な形態で作製することができる。この濃縮は長期培養前、培養中、または培養後に行うことができ、当技術分野で公知のいずれの技術によって行ってもよい。骨髄細胞の長期培養系は例えば改変 Dexter 細胞培養法 (Dexter et al., *J. Cell Physiol.* 91:335 (1977) または Witlock-Witte 培養法 (Witlock and Witte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3608-3612 (1982)) を用いて確立および維持することができる。

【 0 4 4 6 】

ある特定の実施形態では、遺伝子治療の目的で導入する核酸は作動可能なようにコード領域に連結された誘導プロモーターを含み、これにより、適当な転写インデューサーの存在・不在を制御することで核酸の発現を制御できる。

【 0 4 4 7 】

3. プロドラッグ

腫瘍を治療する方法も提供される。本方法は CVSP14 により特定の部位で切断されて有効薬を放出するプロドラッグを投与することにより実施される。CVSP14 活性を発現する細胞と接触した際、プロドラッグは有効薬へと変換される。このプロドラッグは薬物または薬剤がコンジュゲートとしては不活性である、または細胞に入ることができないが、切断された際に活性化されるように標的 CVSP14 の基質と結合された細胞傷害剤などの抗腫瘍薬またはその他の治療薬 (TA) などの有効薬を含むコンジュゲートであってよい。例えばこのプロドラッグはオリゴペプチド、典型的には比較的短い約 10 未満のアミノ酸のペプチドを含むものであってよく、すなわち標的 CVSP14 によってタンパク質分解切断される。細胞傷害剤としては、限定されるものではないが、アルキル化剤、抗増殖剤およびチューブリン結合剤が挙げられる。その他、ビンカ薬、マイトマイシン、ブレオマイシンおよびタキサンがある。

【 0 4 4 8 】

M. 動物モデル

本明細書ではマウスおよびラットをはじめとする齧歯類、ウシ、ニワトリ、ブタ、ヤギ、

10

20

30

40

50

ヒツジ、ゴリラその他の靈長類などのトランスジェニック動物モデルおよび動物が提供される。特にCVSP14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または内在遺伝子のプロモーター領域およびその他の調節領域を置換または改変することによるなどしてポリペプチドの発現が変化させてあるトランスジェニック動物が提供される。

【0449】

このような動物は強力なプロモーターの下、同種または相同組換えまたはその他の組換えによって発現させることによるなどして過剰発現または異常発現させることができる外的CVSP14遺伝子との組換えを促進することにより作出することができる。例えばトランスジェニック動物はベクターまたはその他の様式の遺伝子送達を用いて胚幹細胞などの生殖系細胞へ核酸を導入することによって作出できる。典型的には核酸を胚幹細胞などへ導入し、次にこれを胚由来幹(ES)細胞をCVSP14ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターで形質転換し、そのES細胞を胚盤胞へ注入し、その胚盤胞を代理母に移植し、その後トランスジェニック動物を誕生させる。一般に動物の染色体への導入は異種CVSP14をコードする核酸と内在する核酸の間の組換えによって起こる。この異種核酸は特定の染色体ヘターゲッティングすることができる。

【0450】

場合によってはノックアウト動物を作出することもできる。このような動物はまず、その染色体中のCVSP14ポリペプチド遺伝子と生物学的に不活性とされている外的CVSP14ポリペプチド遺伝子の間の相同組換えを促進することにより(典型的には異種配列、例えば、抗生物質耐性遺伝子の挿入による)作出することができる。ある実施形態では、この相同組換えは胚由来幹(ES)細胞を挿入により不活性化されたCVSP14ポリペプチド遺伝子を含むベクターで、相同組換えが起こるように形質転換した後、そのES細胞を胚盤胞へ注入し、その胚盤胞を代理母に移植し、その後にCVSP14ポリペプチド遺伝子が不活性化されたキメラ動物(「ノックアウト動物」)を誕生させることにより行う(Capecchi, *Science* 244:1288-1292 (1989)参照)。このキメラ動物は同系接合性ノックアウト動物を作出するために同系交配させることができ、次にこれを用いてさらなるノックアウト動物を作出することができる。

【0451】

ノックアウト動物としては、限定されるものではないが、マウス、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウシおよびその他の非ヒト動物が挙げられる。例えばノックアウトマウスが作出される。このようなノックアウト動物は新生物形成疾患を発症する、または発症する素因を持つと予想されることから、このような疾患の動物モデルとして、例えばこのような疾患または疾患を治療または予防する能力を、あるいはその能力に関して試験化合物をスクリーニングするために使用することができる。このような動物はまず、その染色体上のCVSP14遺伝子と、過剰発現または異常発現する(一般に強力なプロモーター下での発現による)外的CVSP14ポリペプチド遺伝子との間の相同組換えを促進することにより作出することができる。ある実施形態では、この相同組換えは、胚由来幹(ES)細胞を過剰発現または異常発現CVSP14ポリペプチド遺伝子を含むベクターで相同組換えが起こるように形質転換した後、そのES細胞を胚盤胞に注入し、その胚盤胞を代理母に移植し、その後にCVSP14遺伝子が過剰発現または異常発現しているキメラ動物を誕生させることによって行う(Capecchi, *Science* 244:1288-1292 (1989)参照)。このキメラ動物は過剰発現または異常発現CVSP14ポリペプチドを有するさらなる動物を作出するために同系交配させることができる。このような動物としては、限定されるものではないが、マウス、ハムスター、ヒツジ、ブタ、ウシおよびその他の非ヒト動物が挙げられる。特定の実施形態では過剰発現または異常発現CVSP14ポリペプチドを有するマウスを作出する。

【0452】

以下の実施例は単に例を示すためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0453】

10

20

30

40

50

CVSP14の同定

前立腺腫瘍サンプルからの一本鎖cDNAの調製

ヒト前立腺腫瘍CWR22Rをヌードマウスで増殖させた。CWR22R組織を摘出し、トリゾール(T RIZOL)試薬(Gibco BRL)中に入れ、製造業者の説明書に従って全RNAを精製した。オリゴテックス mRNAミニキット(Qiagen)を用い、全RNAからポリA⁺ RNAをさらに精製した。一本鎖cDNAをスーパースクリプト第一鎖合成系(Gibco BRL)を用いて合成した。ランダムヘキサマーまたはオリゴ(dT)のいずれかを用いて第一鎖cDNAの合成をプライミングした。

【0454】

縮重プライマーPCRによるセリンプロテアーゼプロファイリング

セリンプロテアーゼドメインは触媒ヒスチジン(DSPP1)と触媒セリン(DSPP2)をフランキングするコンセンサス配列から設計した縮重プライマーを用いて増幅した。用いたセンスプライマー(DSPP1)の配列は以下の通りである(配列番号7): 5'-TGG (GA)TI (ACG)TI (TA)(C G)I GCI (AG)CI CA(TC) TG-3'(括弧内のヌクレオチドは等モル混合物を表し、Iはデオキシイノシンを表す)。用いたアンチセンスプライマー(DSPP2)は以下の通りである(配列番号8): 5'-IGG ICC ICC I(CG)(TA) (GA)TC ICC (TC)TI (AG)CA IG(TAC) (AG)TC-3'。ランダムヘキサマーおよびオリゴ(dT)でプライミングしたcDNAをPCR反応の錆型として用いた。PCR産物をアガロースゲル上で分離し、450~550bp間の全ての産物をゲルから抽出し、pCR2.1-TOP0クローニングベクター(Invitrogen)へサブクローニングした。PCRにより生じたインサートを含むプラスミドはEcoR I消化産物のアガロースゲル電気泳動により確認した。450~550bpのインサートを含むプラスミドに対してDNAシーケンシングを行った。これらのクローンのうちの一つが、新規なセリンプロテアーゼのプロテアーゼドメインの部分をコードしている474bpのインサートを含んでいた。このセリンプロテアーゼ配列を以下、CVSP14と呼ぶ。

【0455】

ランダムヘキサマーおよびオリゴ(dT)でプライミングしたcDNAをPCR反応の錆型として用いた。PCR産物をアガロースゲル上で分離し、450~550bp間の全ての産物をゲルから抽出し、pCR2.1-TOP0クローニングベクター(Invitrogen)へサブクローニングした。PCRにより生じたインサートを含むプラスミドはEcoR I消化産物のアガロースゲル電気泳動により確認した。450~550bpのインサートを含むプラスミドに対してDNAシーケンシングを行った。これらのクローンのうちの一つが、新規なセリンプロテアーゼのプロテアーゼドメインの部分をコードしている474bpのインサートを含んでおり、これを本明細書ではCVSP14と呼ぶ。

【0456】

ヒトゲノムデータベースhtgs(Unfinished High Throughput Genomic Sequences)のBLAST検索から、この配列がヒト第11染色体に由来するゲノム配列AC012228と一致することが明らかとなった。

【0457】

CVSP14のプロテアーゼドメインをコードするcDNAのクローニング

クローンキャップチャーカDNAセレクションキット(Clontech)を用いてCVSP14プロテアーゼドメインをコードするcDNAを得た。ビオチン-21-dUTPの存在下でDSPP1およびDSPP2プライマーを用いるPCRによって、CVSP14のビオチニル化した474bpの部分cDNAクローンを作製した。このビオチニル化産物をゲル精製し、ReCAを媒介とするクローンキャップチャーフ法でプローブとして用いた。ヒト前立腺癌cDNAライブラリー(Gibco BRL カタログ番号11597-010)をcDNA源としても用いた。キャップチャーハしたcDNAをエレクトロポレーションによりエレクトロマックスDH10B細胞に形質転換し、CVSP14プロテアーゼドメインを含む陽性クローンを、非ビオチニル化DSPP1およびDSPP2 PCR産物を用いたコロニーハイブリダイゼーションにより確認した。陽性クローンはDNAシーケンシングにより確かめた。4つの陽性クローンについてDNAシーケンシング解析を行ったところ、全てのクローンがセリンプロテアーゼのプロテアーゼドメインをコードするcDNAを含んでいることが示された。このCVSP14プロテアーゼドメインをコードするcDNAは756bpからなり、251個のアミノ酸へと翻訳される。

10

20

30

40

50

このタンパク質データベースのBLAST解析から、このセリンプロテアーゼガツメガエル(*Xenopus*)オビダクチンのセリンプロテアーゼドメインの一つ(Genbank受託番号U81291およびT30338)と47%の同一性という最も高い相同意を持っていますことが示された。

【0458】

ヒトCVSP14全長cDNAのクローニング

残りのCVSP14の5'上流cDNAを得るために、ジーンレーザー(GeneRacer)キット(Ambion, フタログ番号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。ジーンレーザーキットは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'-GTTAAGCGGCCAGCCTGCAGTTGTAC-3'配列番号 10 とともにジーンレーザー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。

【0459】

次のネスティッドPCRは遺伝子特異的プライマーGX-SP1-1AS, 5'-GCTCTCCTGGGTCTGTCTGGCTTAAGTC-3'配列番号19(最初の5'RACE産物を鋳型として使用)とともにジーンレーザー5'ネスティッドプライマーを用いて行った。RACE反応から得られた500bpを超えるPCR産物をアガロースゲルから精製し、pCR2.1-TOPOクローニングベクター(Invitrogen, Carlsbad, CA)へサブクローニングした。次にCVSP14配列を含む陽性コロニーを確認するためコロニーハイブリダイゼーションを行った。配列AAACTATGAGT(配列番号20)内にATG開始コードを含む第二の5'-RACE産物から279bpの付加配列を得た。

10

20

【0460】

CVSP14のヌクレオチドおよびタンパク質配列

ヒトCVSP14のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下、および配列番号12および13に示す。

【表2】

GAT TCA CCA CGT CTT GGT TAA TGA ATA AAC TTG TTT TAA ATT GGC TTA TTG CTG
 GTC TCT CAA GGC TTC CTA TTT TTG TTT GCT TTA GTC TCT CTA AAA TTT CAG GGA AAA ACT
 115/1 145/11
 ATG AGT CTC AAA ATG CTT ATA AGC AGG AAC AAG CTG ATT TTA CTA CTA GGA ATA GTC TTT
 M S L K M L I S R N K L I L L L G I V F
 175/21 205/31
 TTT GAA CAA GGT AAA TCT GCA GCT CTT TCG CTC CCC AAA GCT CCC AGT TGT GGG CAG AGT
 F E Q G K S A A L S L P K A P S C G Q S
 235/41 265/51
 CTG GTT AAG GTA CAG CCT TGG AAT TAT TTT AAC ATT TTC AGT CGC ATT CTT GGA GGA AGC
 L V K V Q P W N Y F N I F S R I L G G S
 295/61 325/71
 CAA GTG GAG AAG GGT TCC TAT CCC TGG CAG GTA TCT CTG AAA CAA AGG CAG AAG CAT ATT
 Q V E K G S Y P W Q V S L K Q R Q K H I
 355/81 385/91
 TGT GGA GGA AGC ATC GTC TCA CCA CAG TGG GTG ATC ACG GCG GCT CAC TGC ATT GCA AAC
 10

C G G S I V S P Q W V I T A A H C I A N
 415/101 445/111
 AGA AAC ATT GTG TCT ACT TTG AAT GTT ACT GCT GGA CAG TAT GAC TTA AGC CAG ACA GAC
 R N I V S T L N V T A G E Y D L S Q T D
 475/121 505/131
 CCA GGA GAG CAA ACT CTC ACT ATT GAA ACT GTC ATC ATA CAT CCA CAT TTC TCC ACC AAG
 P G E Q T L T I E T V I I H P H F S T K
 535/141 565/151
 AAA CCA ATG GAC TAT GAT ATT GCC CTT TTG AAG ATG GCT GGA GCC TTC CAA TTT GGC CAC
 K P M D Y D I A L L K M A G A F Q F G H
 595/161 625/171
 TTT GTG GGG CCC ATA TGT CTT CCA GAG CTG CGG GAG CAA TTT GAG GCT GGT TTT ATT TGT
 F V G P I C L P E L R E Q F E A G F I C
 655/181 685/191
 ACA ACT GCA GGC TGG GGC CGC TTA ACT GAA GGT GGC GTC CTC TCA CAA GTC TTG CAG GAA
 T T A G W G R L T E G G V L S Q V L Q E
 715/201 745/211
 GTG AAT CTG CCT ATT TTG ACC TGG GAA GAG TGT GTG GCA GCT CTG TTA ACA CTA AAG AGG
 V N L P I L T W E E C V A A L L T L K R
 775/221 805/231
 CCC ATC AGT GGG AAG ACC TTT CTT TGC ACA GGT TTT CCT GAT GGA GGG AGA GAC GCA TGT
 P I S G K T F L C T G F P D G G R D A C
 835/241 865/251
 CAG GGA GAT TCA GGA GGT TCA CTC ATG TGC CGG AAT AAG AAA GGG GCC TGG ACT CTG GCT
 Q G D S G G S L M C R N K K G A W T L A
 895/261 925/271
 GGT GTG ACT TCC TGG GGT TTG GGC TGT GGT CGA GGC TGG AGA AAC AAT GTG AGG AAA AGT
 G V T S W G L G C G R G W R N N V R K S
 955/281 985/291
 GAT CAA GGA TCC CCT GGG ATC TTC ACA GAC ATT AGT AAA GTG CTT TCC TGG ATC CAC GAA
 D Q G S P G I F T D I S K V L S W I H E
 1015/301 1045/311
 CAC ATC CAA ACT GGT AAC TAA
 H I Q T G N *
 20

* 下線はシグナルペプチドを示す。

【0461】

CVSP14の配列解析およびドメインの構築

CVSP14 DNAおよびタンパク質配列をDNAストライダー(バージョン1.2)を用いて解析した。CVSP14のORFは921bpからなり、306個のアミノ酸のタンパク質へと翻訳される。SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)プログラム <http://smart.embl-heidelberg.de>を用いたタンパク質配列解析から、CVSP14はN末端にシグナルペプチド(アミノ酸1~25)、その後にトリプシン様セリンプロテアーゼドメイン(アミノ酸55~306)を有する分泌型セリンプロテアーゼであることが示された。このアミノ酸およびヌクレオチド配列は配列番号12および13に示されている。

【0462】

正常および腫瘍組織でのCVSP14の遺伝子発現プロフィール

CVSP14転写物の遺伝子発現プロフィールに関する情報を得るため、数種類のヒト成人組織(Clontech, カタログ番号K1420-1)、胎児組織(カタログ番号K1425-1)および原発腫瘍(ヒト腫瘍マルチプルティッシュcDNAパネル, カタログ番号K1522-1, CLONTECH)からなるcDNAパネルで、CVSP14特異的プライマーGX-SP1-1(配列番号9)(5'-GACTTAAGCCAGACAGACCCAGGAG AGC-3')およびGX-SP1-2AS(5'-TTGTGAGAGGACGCCACCTTCAGTTAAGC-3')(配列番号10)を用いて

10

20

30

40

50

PCR解析を行った。

【0463】

35回のPCRサイクルの後、腎臓cDNAのみでCVSP14の高い発現を示す強い強度のDNAバンド(246bp)が検出された。肺cDNAでは中程度の強度のDNAバンドが見られ、胎盤cDNAでは弱いバンドが見られた。胎児組織または腫瘍cDNAではいずれも検出可能なシグナルは認められなかつた。40回のPCRサイクルの後では、成人肝臓、肺臓、胎児心臓、胎児肺、胎児骨格筋、胎児胸腺、大腸腺癌(CX-1)および肺臓腺癌(GI-103)でさらなるシグナルが検出できる。

【0464】

DSPP1およびDSPP2プライマーによって生じた474bpのPCR産物を用いて68種のヒト腫瘍および同じ個体に由来する対応する正常組織から合成されたcDNAかなるcDNAプロット(カタログ番号7840-1 ヒト腫瘍/正常発現対アレイ; CLONTECH)、ならびに72の異なるヒト組織から抽出したRNAからなるドットプロット(Human Multiple Tissue expression(MTE)アレイ; Clontech, Palo Alto, CA; カタログ番号7776-1)をプロービングした。15の正常な腎臓cDNAサンプルのうち6サンプルでCVSP14の高い発現を示す強いシグナルが検出され、さらに8つの正常腎臓cDNAサンプルで中程度から弱いシグナルが検出できた。対となる腎腫瘍サンプルでは全てCVSP14シグナルは弱くなつた。3ペアの前立腺正常/腫瘍cDNAサンプルでは全て弱いシグナルが検出された。9つの正常乳房サンプルのうち3サンプルでも弱いシグナルが検出された。7つの子宮腫瘍のうち1つでも弱いシグナルが検出されたが、対となるそれらの正常組織では検出されなかつた。3つの正常肺組織サンプルのうち2サンプルでも弱いシグナルが検出されたが、それらの対となる腫瘍サンプルでは検出されなかつた。HeLa細胞、バーキットリンパ腫Daudi細胞、慢性骨髓性白血病K562、前骨髓性白血病HL-60細胞、メラノーマG361細胞、肺癌A549細胞、リンパ芽球性白血病MOLT-4および結腸直腸腺癌SW480細胞をはじめとする種々の腫瘍細胞株からのcDNAサンプルでは極めて弱いシグナルが見られた。

【0465】

MTE解析の結果からはCVSP14転写物がリンパ節では中程度、心臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸(上行結腸、横行結腸および下行結腸)、腎臓、骨格筋、肺、胎盤、肝臓、肺臓および唾液腺では弱く発現することが示された。

【実施例2】

【0466】

プロテアーゼCVSPドメインの発現

CVSP14およびそのプロテアーゼドメインをそれぞれコードする核酸はピキア・パストリス(Pichia pastoris)ベクターpPIC9K(Invitrogenから入手可能;配列番号11参照)の誘導体へクローニングすることができる。プラスミドpPIC9Kの特徴としては1~948に5'AOX1プロモーター断片;855~875に5'AOX1プライマー部位;949~1218に因子分泌シグナル;1152~1172に因子プライマー部位;1192~1241に多重クローニング部位;1327~1347に3'AOX1プライマー部位;1253~1586に3'AOX1転写終結領域;4514~1980にHIS4 ORF;5743~4928にカナマイシン耐性遺伝子;6122~6879に3'AOX1断片;7961~7288にCoIE1オリジン;および8966~8106にアンピシリン耐性遺伝子を含む。このプラスミドはカナマイシン耐性遺伝子のXhol部位を除去することによってpPIC9Kから得られたものであり、得られたベクターは本明細書ではpPIC9Kxと呼ぶ。

【0467】

CVSP14のプロテアーゼドメインのC122S突然変異誘発

CVSP14のプロテアーゼドメインをコードする遺伝子をPCR SOE(PCRを基にした、重複伸張によるスプライシング)により変異誘発して122番の不対システイン(キモトリプシンナンバリング系;配列番号13のCVSP14のシステイン166)をセリンで置換した。各々166番のセリンのAGTコドンを含む2つの重複する遺伝子断片を以下のプライマー:5' 遺伝子断片としてTCTCTCGAGAAAAGAATTCTTGGAGGAAGCCAAGTGGAG(配列番号14)およびTTTGTGGGCCCATAGTCTTCCAGAGCTCGGG(配列番号15);3' 遺伝子断片としてATTGCGGGCGCTTAGTT-ACCAGTTGGATGTGTTCGTG(配列番号16)およびCCGCAGCTCTGGAAGACTTATGGGCCCCACAAA(配列番号17)を用いてPCR増

10

20

30

40

50

幅した。増幅した遺伝子断片を1%アガロースゲルで精製して混合し、再びPCR増幅してCVS P14 C122S(Cys₁₆₆ 配列番号13; Cys₁₁₁ 配列番号6)のプロテアーゼドメインの全長コード配列を作製した。次にこの配列を制限酵素NotIおよびXholで切斷し、ベクターpPic9KXに連結した。

【0468】

CVSP14発現ベクターの構築

C122S点突然変異(すなわち、CVSP14C122S、配列番号12および13のC₁₆₆番)を含むCVSP14をコードするcDNAをpPIC9Kx:CVSP14C122Sからクローニングした。プライマーCVSP14-5' GG AATTCATATGAGCAGCGGCCATATCGACGACGACAAATTCTGGAGGAAGCCAAGTGGAG(NdeI制限部位を含む;配列番号21)およびCVSP14-3' CCGCTCGAGGTTACCAGTTGGATGTGTCGTGG(Xhol制限部位を含む;配列番号22)を用い、チモーゲン活性化のエンテロキナーゼ認識配列(DDDDK)を利用してヒトCVSP14プロテアーゼドメインをPCR増幅した。増幅は20mMトリス-HCl(pH8.75、25°C)、10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、2mM MgSO₄、0.1%トリトンX-100、0.1mg/ml BSA、0.2mM dNTP、1.0ユニットのACCUZYME DNAポリメラーゼ(Bioline USA, Inc., New Jersey)および100pmolのプライマーを含有する総量50μlで行った。この反応混合物を95°Cで5分間加熱した後、95、60および75°Cで各30秒間の25サイクルを行い、最後に75°Cで2分間伸張させた。

【0469】

PCR産物はQIAquick PCR精製キット(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)を用いて精製した。PCR産物は10ユニットのNdeIと10ユニットのXholを用いて37°Cで2時間二重消化した。消化断片を1.4%アガロースゲルで精製し、臭化工チジウムで染色した。CVSP14 cDNAを含むバンドを切り出し、QIAEX IIゲル抽出キット(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)を用いて精製した。次に標準的な方法を用いてCVSP14 cDNAをpET21b発現ベクター(Novagen, Inc., Madison, WI)のNdeIおよびXhol部位へクローニングした。このベクターは固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)による精製のためにC末端6xHISタグを融合させるものである。コンピテントXL10細胞(Stratagene)をこのpET21bCVSP14ベクターで形質転換し、プラスミド保存株を作製するために用いた。適切に挿入されたかどうかということとDNA配列は蛍光サーマルダイDNAシーケンシング法ならびに制限消化によって確認した。

【0470】

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(50μg/ml)およびカナマイシン(34μg/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 × 20分)により回収した。

【0471】

この細胞ペレットを5~10mgのライソザイムおよび1ユニットのDNアーゼIを添加した50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、5% LAD0、pH7.4(25mL)に再懸濁させ、細胞を溶解し、DNAを剪断した。次に得られた溶液を48,000gで20分間遠心分離した。上清を廃棄し、封入体ペレットを上記溶解バッファー、次いで界面活性剤を除いた溶解バッファーでホモジナイズし、各洗浄間に上記のような遠心分離を行うことで洗浄した。次にこの封入体ペレットを25mLの6M GuHCl、20mM トリス-HCl、300mM NaCl、20mM Me、pH8.0に溶解した。その後この溶液を48,000gで30分間遠心分離して粒子物質を除去した。

【0472】

得られた溶液を0.2μmシリジフィルターで濾過した後、6M GuHCl、20mMトリス-HCl、300mM NaCl、pH8.0で予め平衡化した25ml Ni-NTA樹脂(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA)上に添加した。このカラムを2カラム量の平衡バッファー、次いで3カラム量の8M尿素、20mMトリス-HCl、300mM NaCl、pH8.0で洗浄した。次に精製封入体を2カラム量の8M尿素、20mMトリス-HCl、300mM NaCl、1Mイミダゾール、pH8.0で溶出させた。

10

20

30

40

50

【0473】

CVSP14の再折りたたみはこの封入体混合物を蠕動ポンプを用いて8Lの100mMトリス-HCl、150mM NaCl、7.5mMシスティン、1mMシスチン、0.5Mアルギニン、3g/Lコール酸、pH8.0にゆっくり加えることで行った。この再折りたたみ混合物を7日間またはエルマン試薬によって検出されるチオール濃度が1mM未満となるまで4¹⁰で攪拌した。この再折りたたみ溶液を1μMフィルターで濾過し、限外濾過により濃縮し、バッファーをPBS、3g/Lコール酸、pH8.0に交換した。

【0474】

CVSP14の活性化は1~10U/mlのEKMax(Invitrogen, Carlsbad, CA)を添加し、反応が完了するまで(通常4~8日間)4¹⁰でインキュベートすることにより行った。グリコシル化エンテロキナーゼと結合するConA樹脂少量でこの溶液を処理することで残留しているEKMaxを除去した。EKMaxが完全に除去されたかどうかは特異性エンテロキナーゼ蛍光基質に対する溶液の活性を測定することにより確認した。

【0475】

得られた溶液を一連のプロテアーゼ基質: spec-tPa、spec-PL、spec-fXIIa(American Diagnostics)、S-2239、S-2266(Kabi Diagnostics)、S-2586、S-2366、S-2444、S-2288、S-251、S-2302、S-2765、S-2222、spec-TH(Chromogenix)、およびspec-fVIIa(Pentapharm)に対する活性に関してスクリーニングした。CVSP14はこれら基質のいくつかにいくらか活性を示したが、S-2366(DiaPharma, Westchester, OH)に対する活性が最も高かった。

【実施例3】

【0476】

CVSPの活性を調節する候補化合物を同定するアッセイ

阻害剤を同定するアッセイ

試験化合物がCVSP14の触媒活性阻害剤として作用する能力はアミド分解アッセイで評価することができる。組換えCVSPまたはそのプロテアーゼドメイン部分によるアミド分解活性の阻害剤により誘導される阻害はこのようなアッセイにおけるIC50値により測定することができる。

【0477】

上記のようにして発現させたCVSP14のプロテアーゼドメインをCostar 96ウェル組織培養プレート(Corning NY)で以下のような種々の試験化合物により阻害されるかどうかアッセイした。阻害剤を伴わずに、あるいは100000nMの阻害剤および1x原液バッファー(29.2mMトリス、pH8.4、29.2mMイミダゾール、217mM NaCl(最終量100μL))に対する7種の1:6希釈液とともにおよそ1~10nMのプロテアーゼを加え、室温で30分間インキュベートした。400μMの基質S-2366(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; DiaPharma, Westchester, OH)を加え、SpectraMAX Plusマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale CA)にて37²⁰で20分間405nmの吸光度の変化を追跡することで反応をモニタリングした。

【0478】

基質の同定

アッセイで用いる特定の基質は基質試験により実験的に同定することができる。以下の基質リストは試験可能なものの例である。

【表3】

基質名	構造
S 2366	pyroGlu-Pro-Arg-pNA.HCl
スペクトリノーゲン t-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA.AcOH
N-p-トル-Arg-Pro-Arg-pNA	N-p-トル-Arg-Pro-Arg-pNA
ペソツイル-Val-Gly-Arg-pNA	ペソツイル-Val-Gly-Arg-pNA
ペファクローム t-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA
S 2765	N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl
S 2444	pyroGlu-Gly-Arg-pNA.HCl
S 2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl
スペクトリノーゲン UK	Cbo-L-(γ)Glu(α -t-BuO)-Gly-Arg-pNA.2AcOH
S 2302	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl
S 2266	H-D-Val-Leu-Arg-pNA.2HCl
S 2222	Bz-Ile-Glu(g-OR)-Gly-Arg-pNA.HCl R = H(50%) 及び R = CH ₃ (50%)
クロモザイム PK	ペソツイル-Pro-Phe-Arg-pNA
S 2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl
S 2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA.2HCl
スペクトリノーゲン PI	H-D-Nle-HHT-Lys-pNA.2AcOH Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC H-Arg-Gln-Arg-Arg-AMC Boc-Gln-Gly-Arg-AMC Z-Arg-Arg-AMC
スペクトリノーゲン THE	H-D-HHT-Ala-Arg-pNA.2AcOH
スペクトリノーゲン fXIIa	H-D-CHT-Gly-Arg-pNA.2AcOH CVS 2081-6 (MeSO ₂ -dPhe-Pro-Arg-pNA) ペファクローム fVIIa (CH ₃ SO ₂ -D-CHA-But-Arg-pNA)

pNA=パラニトラニリド(発色性)

AMC=アミノメチルクマリン(蛍光性)

【0479】

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。要するにプロテアーゼが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。

【実施例4】

【0480】

他のアッセイ

これらのアッセイはMTSP1に関して記載するが、このようなアッセイはCVSP14を伴った使用用に容易に適合させることができる。

【0481】

マトリプターゼまたはMTSP1のセリンプロテアーゼ活性の阻害を測定するアミド分解アッセイ

試験化合物がrMAP触媒活性の阻害剤として作用する能力をIC₅₀値によって測定される、MAPによるアミド分解活性の、阻害剤によって誘導される阻害を調べることによって評価した。アッセイバッファーはHBSA(10mM Hepes、150mM塩化ナトリウム、pH 7.4、0.1%ウシ血清アルブミン)とした。特に断りのない限り、試薬は全てSigma Chemical Co. (St. Louis, MO)から入手した。

10

20

30

40

50

【0482】

2つのIC₅₀アッセイ、すなわち(a)30分または60分(試験化合物および酵素の30分または60分のプレインキュベーション)のものと(b)0分(試験化合物および酵素のプレインキュベーションなし)のものを行った。30分または60分のIC₅₀アッセイではCorningマイクロタイターブレートの適当なウェル中で以下の試薬を混合した: HBSA 50 μl、HBSAに希釈(広い濃度領域にわたる)した試験化合物(または非阻害速度の測定に対してはHBSA単独)50 μl、およびバッファーに希釈したrMAP(Corvas International)50 μlで、活性部位の濾過によって測定すると最終酵素濃度は250pMとなった。周囲温度で30分または60分インキュベートした後、各ウェルに50 μlの基質S-2765(N- -ベンジルオキシカルボニル-D-アルギニル-L-グリシル-L-アルギニン-p-ニトロアニリンジヒドロクロロリド; DiaPharma Group, Inc.; Franklin, OH)を加えて最終アッセイ量200 μl、最終基質濃度100 μM(約4倍のK_m)とすることでアッセイを開始した。S-2765はアッセイ混合物に加える前に脱イオン水で再構成し、HBSAで希釈した。0分のIC₅₀アッセイでも同様の試薬: HBSA 50 μl、HBSAで希釈(同じ濃度領域にわたる)した試験化合物(または非阻害速度の測定に対してはHBSA単独)50 μl、および基質S-2765 50 μlを混合した。50 μlのrMAPを加えることでアッセイを開始した。全ての化合物の最終濃度は両IC₅₀アッセイ(30分または60分、および0分)で同じであった。

【0483】

発色基質の加水分解の初速度は、両アッセイで添加基質量の5%未満を用い、Thermo Max(登録商標)カイネティックマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して、5分間にわたる405nmでの吸光度の変化により測定した。加水分解の初速度を50%低下させる阻害剤の添加濃度を2つのアッセイ(30分または60分、および0分)のそれぞれにおいて個々のIC₅₀値として定義した。

【0484】

特異性の判定のためのin vitro酵素アッセイ

化合物がマトリプターゼ活性の選択的阻害剤として働く能力は、マトリプターゼ活性を50%阻害する試験化合物の濃度(IC₅₀)を上記実施例のように測定し、マトリプターゼのIC₅₀値と以下のセリンプロテアーゼ:トロンビン、組換え組織プラスミノーゲンアクチベーター(rt-PA)、プラスミン、活性化Cタンパク質、キモトリプシン、Xa因子およびトリプシンの全てまたはいくつかに関して測定したものと比較することにより評価した。

【0485】

全てのアッセイで用いたバッファーはHBSA(10mM HEPES, pH7.5、150mM塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミン)であった。

【0486】

IC₅₀測定のためのアッセイはCorningマイクロタイターブレートの適当なウェル中でHBSA 50 μl、HBSAで希釈した特定の濃度(広い濃度領域にわたる)の試験化合物(またはV₀(非阻害速度)の測定に対してはHBSA単独)50 μl、およびHBSAに希釈した酵素50 μlを混合することで行った。周囲温度で30分間インキュベートした後、下記に示された濃度の基質50 μlをウェルに加え、最終総量200 μlとした。発色基質の加水分解の初速度は、添加基質5%未満を用い、Thermo Max(登録商標)カイネティックマイクロプレートリーダーを使用して、5分間にわたる405nmでの吸光度の変化により測定した。加水分解の初速度を50%低下させる阻害剤の添加濃度をIC₅₀値として定義した。

【0487】

トロンビン(fIIa)アッセイ

発色基質ペファクロム(Pefachrome)t-PA(Pentapharm Ltd.から入手したCH₃SO₂-D-ヘキサヒドロチロシン-グリシル-L-アルギニン-p-ニトロアニリンを用いて酵素活性を測定した。基質は使用前に脱イオン水で再構成した。精製ヒト-トロンビンはEnzyme Research Laboratories, Inc.から入手した。全てのアッセイで用いたバッファーはHBSA(10mM HEPES, pH7.5、150mM塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミン)であった。

【0488】

IC₅₀の測定は適当なウェル中でHBSA(50 μL)、 -トロンビン(50 μl)(最終酵素濃度は0.5n

10

20

30

40

50

M)および阻害剤(50 μl)(広い濃度領域にわたる)を混合し、基質ペファクロム-t-PA(50 μl)(最終基質濃度は250 μM、約5倍Km)の添加前に室温で30分間インキュベートすることで行った。ペファクロム-t-PAの加水分解の初速度は、添加基質5%未満を用い、Thermo Max(登録商標)カイネティックマイクロプレートリーダーを使用して、5分間にわたる405nmでの吸光度の変化により測定した。加水分解の初速度を50%低下させる阻害剤の添加濃度をIC₅₀値として定義した。

【0489】

Xa因子

Xa因子の触媒活性はDiaPharma Group(Franklin, OH)から入手した発色基質S-2765(N-ベンジルオキシカルボニル-D-アルギニン-L-グリシン-L-アルギニン-p-ニトロアニリン)を用いて測定した。基質は全て使用前に脱イオン水で再構成した。S-2765の最終濃度は250 μM(約5倍Km)とした。Enzyme Research Laboratories, Inc. (South Bend, IN)から入手した精製ヒトX因子およびXa因子(FXa)を活性化し、記載のようにしてそれから調製した[Bock, P.E., Craig, P.A., Olson, S.T., and Singh, P. Arch. Biochem. Biophys. 273:375-388 (1989)]。アッセイ前に酵素をHBSAで希釈し、最終濃度0.25nMとした。

【0490】

組換え組織プラスミノーゲンアクチベーター(rt-PA)アッセイ

rt-PAの触媒活性は基質ペファクロムt-PA(Pentapharm Ltd.から入手したCH₃SO₂-D-ヘキサヒドロチロシン-グリシル-L-アルギニン-p-ニトロアニリン)を用いて測定した。基質はアッセイ前に脱イオン水で構成した後、HBSAで希釈し、最終濃度500 μM(約3倍Km)とした。ヒトrt-PA(Activase(登録商標))はGenentech Inc.から入手した。この酵素はアッセイ前に脱イオン水で再構成し、HBSAに希釈し、最終濃度1.0nMとした。

【0491】

プラスミンアッセイ

プラスミンの触媒活性はDiaPharmaグループから入手した発色基質S-2366(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)を用いて測定した。基質はアッセイ前に脱イオン水で構成し、HBSAで希釈し、最終濃度300 μM(約2.5倍Km)とした。精製ヒトプラスミンはEnzyme Research Laboratories, Inc.から入手した。この酵素はアッセイ前にHBSAで希釈し、最終濃度1.0nMとした。

【0492】

活性化タンパク質C(aPC)アッセイ

aPCの触媒活性は発色基質ペファクロムPC(Pentapharm Ltd.から入手した-D-カルボベンジルオキシ(carbobenzoxo)-D-リジン-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)を用いて測定した。基質はアッセイ前に脱イオン水で構成し、HBSAで希釈し、最終濃度400 μM(約3倍Km)とした。精製ヒトaPCはHematologic Technologies, Inc.から入手した。この酵素はアッセイ前にHBSAで希釈し、最終濃度1.0nMとした。

【0493】

キモトリプシンアッセイ

キモトリプシンの触媒活性はDiaPharmaグループから入手した発色基質S-2586(メトキシ-スクシニル-L-アルギニン-L-プロリル-L-チロシル-p-ニトロアニリド)を用いて測定した。基質はアッセイ前に脱イオン水で構成した後にHBSAで希釈し、最終濃度100 μM(約9倍Km)とした。精製(3X-結晶化; CDI)ウシ臍臍-キモトリプシンはWorthington Biochemical Corpから入手した。この酵素はアッセイ前に脱イオン水で再構成し、HBSAで希釈し、最終濃度0.5nMとした。

【0494】

トリプシンアッセイ

トリプシンの触媒活性はDiaPharmaグループから入手した発色基質S-2222(ベンゾイル-L-イソロイシン-L-グルタミン酸-[D-メチルエステル]-L-アルギニン-p-ニトロアニリド)を用いて測定した。基質はアッセイ前に脱イオン水で構成した後、HBSAで希釈し、最終濃度250 μM(約4倍Km)とした。精製(3X-結晶化; TRL3)ウシ臍臍トリプシンはWorthington Bioc

10

20

30

40

50

hemical Corpから入手した。この酵素はアッセイ前に脱イオン水で再構成し、HBSAで希釈し、最終濃度0.5nMとした。

【0495】

当業者には種々の改変が明らかであり、本発明は付属の特許請求の範囲によってのみ制限されるものとする。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077263 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12Q
- (21) International Application Number: PCT/US02/09039
- (22) International Filing Date: 20 March 2002 (20.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/278,166 22 March 2001 (22.03.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/278,166 (CIP) Filed on 22 March 2001 (22.03.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): CORVAS INTERNATIONAL, INC. [US/US]; 3030 Science Park Road, San Diego, CA 92121 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): MADISON, Edwin, L. [US/US]; 11005 Cedarcrest Way, San Diego, CA 92121 (US); YEII, Juann-Chern [US]; 11629 Wetsview Parkway, San Diego, CA 92126 (US).
- (74) Agents: SEIDMAN, Stéphanie, L. et al.; Heller Ehrman White & McAuliffe LLP, 4350 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 92122-1246 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, 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, GS, IT, GB, ID, GE, GH, GM, IR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TZ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, TZ, UG, ZM, ZW), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- (84) Designated States (regional): A2 WO 02/077263 A2

Declarations under Rule 4.17:
as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(iii)) for the following designations: AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CZ, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GS, IT, GB, ID, GE, GH, GM, IR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TZ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, TZ, UG, ZM, ZW), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations: AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CZ, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GS, IT, GB, ID, GE, GH, GM, IR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TZ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, TZ, UG, ZM, ZW), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

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.

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING SERINE PROTEASE CVSP14, THE ENCODED POLYPEPTIDES AND METHODS BASED THEREON

(57) Abstract: Provided herein are polypeptides designated CVSP14 polypeptides that exhibit protease activity as a single chain or as an activated two chain form. Methods using the polypeptides to identify compounds that modulate the protease activity thereof are provided. The polypeptides also serve as tumor markers.

-1-

**NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING SERINE PROTEASE CVSP14, THE
ENCODED POLYPEPTIDES AND METHODS BASED THEREON**

RELATED APPLICATIONS

Benefit of priority is claimed to U.S. provisional application Serial No.

- 5 60/278,166, filed March 22, 2001, to Edwin L. Madison and Jiunn-Chern Yeh
entitled "NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING A TRANSMEMBRANE SERINE
PROTEASE 14, THE ENCODED PROTEINS AND METHODS BASED THEREON."
Where permitted, the subject matter of U.S. provisional application is
incorporated by reference in its entirety.

10 FIELD OF THE INVENTION

Nucleic acid molecules that encode proteases and portions thereof,
particularly protease domains are provided. Also provided are prognostic,
diagnostic and therapeutic methods using the proteases and domains thereof and
the encoding nucleic acid molecules.

15 BACKGROUND OF THE INVENTION AND OBJECTS THEREOF

Cancer is a leading cause of death in the United States, developing in one
in three Americans; one of every four Americans dies of cancer. Cancer is
characterized by an increase in the number of abnormal neoplastic cells, which
proliferate to form a tumor mass, the invasion of adjacent tissues by these
20 neoplastic tumor cells, and the generation of malignant cells that metastasize via
the blood or lymphatic system to regional lymph nodes and to distant sites.

Among the hallmarks of cancer is a breakdown in the communication
among tumor cells and their environment. Normal cells do not divide in the
absence of stimulatory signals, and cease dividing in the presence of inhibitory
25 signals. Growth-stimulatory and growth-inhibitory signals are routinely
exchanged between cells within a tissue. In a cancerous, or neoplastic, state, a
cell acquires the ability to "override" these signals and to proliferate under
conditions in which normal cells do not grow.

In order to proliferate tumor cells acquire a number of distinct aberrant
30 traits reflecting genetic alterations. The genomes of certain well-studied tumors
carry several different independently altered genes, including activated
oncogenes and inactivated tumor suppressor genes. Each of these genetic

-2-

changes appears to be responsible for imparting some of the traits that, in the aggregate, represent the full neoplastic phenotype.

A variety of biochemical factors have been associated with different phases of metastasis. Cell surface receptors for collagen, glycoproteins such as 5 laminin, and proteoglycans, facilitate tumor cell attachment, an important step in invasion and metastases. Attachment triggers the release of degradative enzymes which facilitate the penetration of tumor cells through tissue barriers. Once the tumor cells have entered the target tissue, specific growth factors are required for further proliferation. Tumor invasion and progression involves a 10 complex series of events, in which tumor cells detach from the primary tumor, break down the normal tissue surrounding it, and migrate into a blood or lymphatic vessel to be carried to a distant site. The breaking down of normal tissue barriers is accomplished by the elaboration of specific enzymes that degrade the proteins of the extracellular matrix that make up basement 15 membranes and stromal components of tissues.

A class of extracellular matrix degrading enzymes have been implicated in tumor invasion. Among these are the matrix metalloproteinases (MMP). For example, the production of the matrix metalloproteinase stromelysin is associated with malignant tumors with metastatic potential (see, e.g., McDonnell 20 *et al.* (1990) *Smnrs. in Cancer Biology* 1:107-115; McDonnell *et al.* (1990) *Cancer and Metastasis Reviews* 9:309-319).

The capacity of cancer cells to metastasize and invade tissue is facilitated by degradation of the basement membrane. Several proteinase enzymes, including the MMPs, have been reported to facilitate the process of invasion of 25 tumor cells. MMPs are reported to enhance degradation of the basement membrane, which thereby permits tumorous cells to invade tissues. For example, two major metalloproteinases having molecular weights of about 70 kDa and 92 kDa appear to enhance ability of tumor cells to metastasize.

Serine Proteases

Serine proteases (SPs) have been implicated in neoplastic disease progression. Most serine proteases, which are either secreted enzymes or are sequestered in cytoplasmic storage organelles, have roles in blood coagulation, 5 wound healing, digestion, immune responses and tumor invasion and metastasis. A class of cell surface proteins designated type II transmembrane serine proteases, which are membrane-anchored proteins with additional extracellular domains, has been identified. As cell surface proteins, they are positioned to play a role in intracellular signal transduction and in mediating cell surface 10 proteolytic events. Other serine proteases can be membrane bound and function in a similar manner. Others are secreted. Many serine proteases exert their activity upon binding to cell surface receptors, and, hence act at cell surfaces. Cell surface proteolysis is a mechanism for the generation of biologically active proteins that mediate a variety of cellular functions.

15 Serine proteases, including secreted and transmembrane serine proteases, have been implicated in processes involved in neoplastic development and progression. While the precise role of these proteases has not been elaborated, serine proteases and inhibitors thereof are involved in the control of many intra- and extracellular physiological processes, including degradative actions in cancer 20 cell invasion, metastatic spread, and neovascularization of tumors, that are involved in tumor progression. It is believed that proteases are involved in the degradation of extracellular matrix (ECM) and contribute to tissue remodeling, and are necessary for cancer invasion and metastasis. The activity and/or expression of some proteases have been shown to correlate with tumor 25 progression and development.

For example, a membrane-type serine protease MTSP1 (also called matriptase; see SEQ ID Nos. 1 and 2 from U.S. Patent No. 5,972,616; and GenBank Accession No. AF118224; (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18231-18236; U.S. Patent No. 5,792,616; see, also Takeuchi (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 30 U.S.A. 96:11054-1161) that is expressed in epithelial cancer and normal tissue (Takeuchi *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11054-61) has been identified. Matriptase was originally identified in human breast cancer cells as a

-4-

major gelatinase (see, U.S. Patent No. 5,482,848), a type of matrix metalloprotease (MMP). It has been proposed that it plays a role in the metastasis of breast cancer. Matriptase also is expressed in a variety of epithelial tissues with high levels of activity and/or expression in the human 5 gastrointestinal tract and the prostate. MTSPs, designated MTSP3, MTSP4, MTSP6 have been described in published International PCT application No. WO 01/57194, based in International PCT application No. PCT/US01/03471. Prostate-specific antigen (PSA), a kallikrein-like serine protease, degrades 10 extracellular matrix glycoproteins fibronectin and laminin, and, has been postulated to facilitate invasion by prostate cancer cells (Webber *et al.* (1995) *Clin. Cancer Res.* 1:1089-94). Blocking PSA proteolytic activity with 15 PSA-specific monoclonal antibodies results in a dose-dependent decrease *in vitro* in the invasion of the reconstituted basement membrane Matrigel by LNCaP human prostate carcinoma cells which secrete high levels of PSA. 20 Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer (Tanimoto *et al.* (1997) *Cancer Res.*, 57:2884-7). The hepsin transcript appears to be abundant in carcinoma tissue and is almost never expressed in normal adult tissue, including normal ovary. It has been suggested that hepsin is frequently overexpressed in ovarian tumors 25 and therefore can be a candidate protease in the invasive process and growth capacity of ovarian tumor cells. A serine protease-like gene, designated normal epithelial cell-specific 1 (NES1) (Liu *et al.*, *Cancer Res.*, 56:3371-9 (1996)) has been identified. Although expression of the NES1 mRNA is observed in all normal and 30 immortalized nontumorigenic epithelial cell lines, the majority of human breast cancer cell lines show a drastic reduction or a complete lack of its expression. The structural similarity of NES1 to polypeptides known to regulate growth factor activity and a negative correlation of NES1 expression with breast oncogenesis suggest a direct or indirect role for this protease-like gene product in the suppression of tumorigenesis.

Hence transmembrane and other serine proteases and other proteases appear to be involved in the etiology and pathogenesis of tumors. There is a

-5-

need to further elucidate their role in these processes and to identify additional transmembrane proteases. Therefore, it is an object herein to provide serine protease proteins and nucleic acids encoding such proteases that are involved in the regulation of or participate in tumorigenesis and/or carcinogenesis. It is also 5 an object herein to provide prognostic, diagnostic, therapeutic screening methods using such proteases and the nucleic acids encoding such proteases.

SUMMARY OF THE INVENTION

Provided herein is a protein designated CVSP14, including the protease domain thereof (see, e.g., SEQ ID Nos. 5, 6, 12 and 13). CVSP14 is a secreted 10 serine protease. CVSP14 is highly expressed in androgen-independent prostate tumors and is expressed in other tumors. Hence, as a protease it can be involved in tumor progression. By virtue of its functional activity it can be a therapeutic or diagnostic target. The expression and/or activation (or reduction in level of expression or activation) of the expressed protein or zymogen form 15 thereof can be used to monitor cancer and cancer therapy. For example, the expression of the this protein can be used to monitor prostate cancer and prostate cancer therapy.

The serine protease family includes members that are activated and/or expressed in tumor cells at different levels from non-tumor cells; and those from 20 cells in which substrates therefor differ in tumor cells from non-tumor cells or otherwise alter the specificity or activity of the serine protease (SP). The serine protease provided herein, designated herein as CVSP14, is a secreted protease. The protease domain and full-length protein, including the zymogen and activated forms, and uses thereof are also provided. Proteins encoded by splice 25 variants are also provided. Nucleic acid molecules encoding the proteins and protease domains are also provided. The protease domain of a CVSP14 is set forth in SEQ ID No. 6; the sequence of a full length protein is set forth in SEQ ID No. 13. The sequences of encoding nucleic acid molecules are set forth in SEQ ID Nos. 5 and 12, respectively.

30 CVSP14 is expressed as a secreted protein and may bind to cell surface receptors and function as a cell-surface bound protease, such as by binding

-6-

thereto or by dimerization or multimerization with a membrane-bound or receptor-bound protein.

Also provided herein are nucleic acid molecules that encode SP proteins and the encoded proteins. In particular, nucleic acid molecules encoding

5 CVSP14 from animals, including splice variants thereof are provided. The encoded proteins are also provided. Also provided are functional domains thereof. For example, the SP protease domains, portions thereof, and muteins thereof are from or based on animal SPs, including, but are not limited to, rodent, such as mouse and rat; fowl, such as chicken; ruminants, such as goats, 10 cows, deer, sheep; ovine, such as pigs; and humans.

The protease domain for use in the methods and assay provided herein does not have to result from activation, which produces a two chain activated product, but rather is a single chain polypeptide where the N-terminus includes the sequence ↓ILGG. Such polypeptides, although not the result of activation 15 and not two-chain forms, exhibit proteolytic (catalytic) activity. These protease domain polypeptides are used in assays to screen for agents that modulate the activity of the CVSP14.

Such assays are also provided herein. In exemplary assays, the effects of test compounds on the ability of the full length or along at least about 70%, 20 80% or 90% of the full length of the single chain, two chain activated form, or a protease domain, which is a single chain or a two chain activated form, of CVSP14 to proteolytically cleave a known substrate, typically a fluorescently, chromogenically or otherwise detectably labeled substrate, are assessed. Agents, generally compounds, particularly small molecules, that modulate the 25 activity of the protein (full length or protease domain either single or two chain forms thereof) are candidate compounds for modulating the activity of the CVSP14. The protease domains and full length proteins also can be used to produce two-chain and single-chain protease-specific antibodies. The protease domains provided herein include, but are not limited to, the single chain region 30 having an N-terminus at the cleavage site for activation of the zymogen, through the C-terminus, or C-terminal truncated portions thereof that exhibit proteolytic activity as a single-chain polypeptide in *in vitro* proteolysis assays, of any family

member, including CVSP14, such as from a mammal, including human, that, for example, is expressed or active in tumor cells at different levels from non-tumor cells.

Also provided are muteins of the single chain protease domain of CVSP14 5 particularly muteins in which the Cys residue (residue no. 26 in SEQ ID No. 6) in the protease domain that is free (*i.e.*, does not form disulfide linkages with any other Cys residue in the protease domain) is substituted with another amino acid substitution, generally with a substitution that does not eliminate the activity of interest, and muteins in which a glycosylation site(s) is eliminated. Muteins in 10 which other substitutions in which catalytic activity is retained are also contemplated (see, *e.g.*, Table 1, for exemplary amino acid substitutions).

Hence, provided herein is a member of the family of serine proteases designated CVSP14, and functional domains, especially protease (or catalytic) domains thereof, muteins and other derivatives and analogs thereof. Also 15 provided herein are nucleic acids encoding the CVSP14.

The nucleic acid and amino acid sequences of CVSP14 are set forth in SEQ ID Nos. 5 and 6. Nucleic acid molecules that encode a single-chain protease domain or catalytically active portion thereof and also those that encode the full-length CVSP14 (SEQ ID Nos. 12 and 13) are provided. Single 20 amino acid changes are contemplated; for example peptides in which there is an Arg in place of a Gly are provided. Nucleic acid molecules that encode a single-chain protease domain or catalytically active portion thereof and also those that encode the full-length CVSP14 are provided. Also provided are nucleic acid molecules that hybridize to such CVSP14 encoding nucleic acid along their full 25 length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full length and encode the full length or a truncated portion thereof, such as without the signal sequence or a protease domain or catalytically active portion thereof are provided. Hybridization is typically performed under conditions of at least low, generally at least moderate, and often high stringency.

30 Additionally provided herein are antibodies that specifically bind to the CVSP14 and inhibit the activity thereof. Included are antibodies that specifically bind to the protein or protease domain, including to the single and/or two chain

forms thereof. Among the antibodies are two-chain-specific antibodies, and single-chain specific antibodies and neutralizing antibodies. Antibodies that specifically bind to the CVSP14, particularly the single chain protease domain, the zymogen and activated form are also provided herein. Antibodies that 5 specifically bind to the two-chain and/or single-chain form of CVSP14 are provided. The antibodies include those that specifically bind to the two-chain or single-chain form of the protease domain and/or the full-length protein.

Further provided herein are prognostic, diagnostic, therapeutic screening methods using CVSP14 and the nucleic acids encoding CVSP14. Also provided 10 are transgenic non-human animals bearing inactivated genes encoding the CVSP and bearing the genes encoding the CVSP14 under non-native or native promotor control are provided. Such animals are useful in animal models of tumor initiation, growth and/or progression models.

Provided herein are members of a family of serine proteases (SPs) that are 15 expressed in certain tumor or cancer cells such lung, prostate, colon and breast cancers. In particular, it is shown herein, that CVSP14 is expressed in lung carcinoma, leukemia and cervical carcinoma as well as in certain normal cells and tissues (see e.g., EXAMPLES for tissue-specific expression profile). CVSP14 can also be a marker for breast, prostate and colon cancer.

20 SPs are of interest because they appear to be expressed and/or activated at different levels in tumor cells from normal cells, or have functional activity that is different in tumor cells from normal cells, such as by an alteration in a substrate therefor, or a cofactor. CVSP14 is of interest because it is expressed or is active in tumor cells. Hence the CVSP14 provided herein can serve as 25 diagnostic markers for certain tumors. The level of activated CVSP14 can be diagnostic of prostate, uterine, lung or colon cancer or leukemia or other cancer.

Also provided herein are methods of modulating the activity of the 30 CVSP14 and screening for compounds that modulate, including inhibit, antagonize, agonize or otherwise alter the activity of the CVSP14. Of particular interest is the protease domain of CVSP14 that includes the catalytic portion of the protein.

-9-

CVSP14 polypeptides, including, but not limited to splice variants thereof, and nucleic acids encoding CVSPs, and domains, derivatives and analogs thereof are provided herein. Single chain protease domains that contain the N-termini that are generated by activation of the zymogen form of CVSP14 are also 5 provided. The cleavage site for the protease domain is at amino acid 52 (R \downarrow IGGS)(see SEQ ID Nos. 12 and 13).

Also provided are plasmids containing any of the nucleic acid molecules provided herein. Cells containing the plasmids are also provided. Such cells include, but are not limited to, bacterial cells, yeast cells, fungal cells, plant cells, 10 insect cells and animal cells. In addition to cells and plasmids containing nucleic acid encoding the CVSP14 polypeptide, methods of expression of the encoded polypeptide are provided. In order to achieve expression of the protease domain, the nucleic acid encoding the signal sequence is removed. The protein is expressed in the inclusion bodies. The CVSP14 protease domain was then 15 isolated from the inclusion bodies and treated under conditions whereby proper refolding occurred. Hence also provided are methods for producing active CVSP14 protease domain.

Also provided is a method of producing CVSP14 by growing the above-described cells under conditions whereby the CVSP14 is expressed by the cells, 20 and recovering the expressed CVSP14 polypeptide. Methods for isolating nucleic acid encoding other CVSP14s are also provided.

Also provided are cells, generally eukaryotic cells, such as mammalian cells and yeast cells, in which the CVSP14 polypeptide is expressed by the cells. Such cells to which the secreted protein can bind are used in drug screening 25 assays to identify compounds that modulate the activity of the CVSP14 polypeptide. These assays include *in vitro* binding assays, and transcription based assays in which signal transduction mediated directly or indirectly, such as via activation of pro-growth factors, by the CVSP14 or cleavage products thereof is assessed.

30 Further provided herein are prognostic, diagnostic and therapeutic screening methods using the CVSP14 and the nucleic acids encoding CVSP14. In particular, the prognostic, diagnostic and therapeutic screening methods are

-10-

used for preventing, treating, or for finding agents useful in preventing or treating, tumors or cancers such as lung carcinoma, colon adenocarcinoma and ovarian carcinoma.

Also provided are methods for screening for compounds that modulate the activity of CVSP14. The compounds are identified by contacting them with the CVSP14 or protease domain thereof and a substrate for the CVSP14. A change in the amount of substrate cleaved in the presence of the compounds compared to that in the absence of the compound indicates that the compound modulates the activity of the CVSP14. Such compounds are selected for further analyses or for use to modulate the activity of the CVSP14, such as inhibitors or agonists. The compounds also can be identified by contacting the substrates with a cell that binds to a CVSP14 or catalytically active portion thereof.

Also provided herein are modulators of the activity of CVSP14, especially the modulators obtained according to the screening methods provided herein. Such modulators can have use in treating cancerous conditions and other neoplastic conditions.

Pharmaceutical composition containing the protease domain and/or full-length or other domain of a CVSP14 polypeptide are provided herein in a pharmaceutically acceptable carrier or excipient are provided herein.

Also provided are articles of manufacture that contain CVSP14 polypeptide and protease domains of CVSP14 in single chain forms or activated forms. The articles contain a) packaging material; b) the polypeptide (or encoding nucleic acid), particularly the single chain protease domain thereof; and c) a label indicating that the article is for use in assays for identifying modulators of the activities of a CVSP14 polypeptide is provided herein.

Conjugates containing a) a CVSP14 polypeptide or protease domain in single chain form; and b) a targeting agent linked to the CVSP directly or via a linker, wherein the agent facilitates: i) affinity isolation or purification of the conjugate; ii) attachment of the conjugate to a surface; iii) detection of the conjugate; or iv) targeted delivery to a selected tissue or cell, is provided herein. The conjugate can contain a plurality of agents linked thereto. The conjugate can be a chemical conjugate; and it can be a fusion protein.

-11-

In another embodiment, the targeting agent is a protein or peptide fragment. The protein or peptide fragment can include a protein binding sequence, a nucleic acid binding sequence, a lipid binding sequence, a polysaccharide binding sequence, or a metal binding sequence.

5 Methods of diagnosing a disease or disorder characterized by detecting an aberrant level of a CVSP14 in a subject is provided. The method can be practiced by measuring the level of the DNA, RNA, protein or functional activity of the CVSP14. An increase or decrease in the level of the DNA, RNA, protein or functional activity of the CVSP, relative to the level of the DNA, RNA, protein 10 or functional activity found in an analogous sample not having the disease or disorder (or other suitable control) is indicative of the presence of the disease or disorder in the subject or other relative any other suitable control.

Combinations are provided herein. The combination can include: a) an inhibitor of the activity of a CVSP14; and b) an anti-cancer treatment or agent.

15 The CVSP inhibitor and the anti-cancer agent can be formulated in a single pharmaceutical composition or each is formulated in a separate pharmaceutical composition. The CVSP14 inhibitor can be an antibody or a fragment or binding portion thereof made against the CVSP14, such as an antibody that specifically binds to the protease domain, an inhibitor of CVSP14 production, or an inhibitor 20 of CVSP14 membrane-localization or an inhibitor of CVSP14 activation. Other CVSP14 inhibitors include, but are not limited to, an antisense nucleic acid or double-stranded RNA (dsRNA), such as RNAi, encoding the CVSP14 or portions thereof, particularly a portion of the protease domain, a nucleic acid encoding at least a portion of a gene encoding the CVSP14 with a heterologous nucleotide 25 sequence inserted therein such that the heterologous sequence inactivates the biological activity encoded CVSP14 or the gene encoding it. The portion of the gene encoding the CVSP14 typically flanks the heterologous sequence to promote homologous recombination with a genomic gene encoding the CVSP14.

Also, provided are methods for treating or preventing a tumor or cancer in 30 a mammal by administering to a mammal an effective amount of an inhibitor of a CVSP14, whereby the tumor or cancer is treated or prevented. The CVSP14 inhibitor used in the treatment or for prophylaxis is administered with a

-12-

pharmaceutically acceptable carrier or excipient. The mammal treated can be a human. The treatment or prevention method can additionally include administering an anti-cancer treatment or agent simultaneously with or subsequently or before administration of the CVSP14 inhibitor.

5 Also provided is a recombinant non-human animal in which an endogenous gene of a CVSP14 has been deleted or inactivated by homologous recombination or other recombination events or insertional mutagenesis of the animal or an ancestor thereof. A recombinant non-human animal is provided herein, where the gene of a CVSP14 is under control of a promoter that is not 10 the native promoter of the gene or that is not the native promoter of the gene in the non-human animal or where the nucleic acid encoding the CVSP14 is heterologous to the non-human animal and the promoter is the native or a non-native promoter or the CVSP14 is on an extrachromosomal element, such as a plasmid or artificial chromosome. Transgenic non-human animals bearing the 15 genes encoding the CVSP14 and bearing inactivated genes encoding CVSP14, particularly under a non-native promoter control or on an exogenous element, such as a plasmid or artificial chromosome, are additionally provided herein.

Also provided are methods of treatments of tumors by administering a prodrug that is activated by CVSP14 that is expressed or active in tumor cells, 20 particularly those in which its functional activity in tumor cells is greater than in non-tumor cells. The prodrug is administered and, upon administration, active CVSP14 cleaves the prodrug and releases active drug in the vicinity of the tumor cells. The active anti-cancer drug accumulates in the vicinity of the tumor. This is particularly useful in instances in which CVSP14 is expressed or active in 25 greater quantity, higher level or predominantly in tumor cells compared to other cells.

Also provided are methods of identifying a compound that binds to the single-chain or two-chain form of CVSP14, by contacting a test compound with a both forms; determining to which form the compound binds; and if it binds to a 30 form of CVSP14, further determining whether the compound has at least one of the following properties:

(i) inhibits activation of the single-chain zymogen form of CVSP14;

-13-

- (ii) inhibits activity of the two-chain or single-chain form; and
- (iii) inhibits dimerization of the protein.

The forms can be full length or truncated forms, including but not limited to, the protease domain resulting from cleavage at the R1 activation site or from

- 5 expression of the protease domain or catalytically active portions thereof.

Also provided are methods of diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, a malignancy, or other pathologic condition in a subject, by obtaining a biological sample from the subject; exposing it to a detectable agent that binds to a two-chain or single-chain form of CVSP14, where the pathological condition 10 is characterized by the presence or absence of the two-chain or single-chain form.

Methods of inhibiting tumor invasion or metastasis or treating a malignant or pre-malignant condition by administering an agent that inhibits activation of the zymogen form of CVSP14 or an activity of the activated form are provided.

- 15 The conditions include, but are not limited to, a condition, such as a tumor, of the breast, cervix, prostate, lung, ovary or colon.

Methods for monitoring tumor progression and/or therapeutic effectiveness are also provided. The levels of activation or expression of CVSP14 or the protease domain thereof are assessed, and the change in the 20 level, reflects tumor progression and/or the effectiveness of therapy. Generally, as the tumor progresses the amount of CVSP14 in a body tissue or fluid sample increases; effective therapy reduces the level.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A. DEFINITIONS

- 25 Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as is commonly understood by one of skill in the art to which the invention(s) belong. All patents, patent applications, published applications and publications, Genbank sequences, websites and other published materials referred to throughout the entire disclosure herein, unless noted 30 otherwise, are incorporated by reference in their entirety. In the event that there are a plurality of definitions for terms herein, those in this section prevail. Where reference is made to a URL or other such identifier or address, it

-14-

understood that such identifiers can change and particular information on the internet can come and go, but equivalent information can be found by searching the internet. Reference thereto evidences the availability and public dissemination of such information.

- 5 As used herein, the abbreviations for any protective groups, amino acids and other compounds, are, unless indicated otherwise, in accord with their common usage, recognized abbreviations, or the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (see, (1972) *Biochem.* 11:942-944).
- As used herein, serine protease refers to a diverse family of proteases
- 10 wherein a serine residue is involved in the hydrolysis of proteins or peptides. The serine residue can be part of the catalytic triad mechanism, which includes a serine, a histidine and an aspartic acid in the catalysis, or be part of the hydroxyl/ε-amine or hydroxyl/α-amine catalytic dyad mechanism, which involves a serine and a lysine in the catalysis. Of particular interest are SPs of
- 15 mammalian, including human, origin. Those of skill in this art recognize that, in general, single amino acid substitutions in non-essential regions of a polypeptide do not substantially alter biological activity (see, e.g., Watson *et al.* (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p.224).
- 20 As used herein, "transmembrane serine protease (MTSP)" refers to a family of transmembrane serine proteases that share common structural features as described herein (see, also Hooper *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:857-860). Thus, reference, for example, to "MTSP" encompasses all proteins encoded by the MTSP gene family, including but are not limited to: MTSP3, MTSP4,
- 25 MTSP6, MTSP7 or an equivalent molecule obtained from any other source or that has been prepared synthetically or that exhibits the same activity. Other MTSPs include, but are not limited to, corin, enterpeptidase, human airway trypsin-like protease (HAT), MTSP1, TMPRSS2, and TMPRSS4. Sequences of encoding nucleic molecules and the encoded amino acid sequences of exemplary
- 30 MTSPs and/or domains thereof are set forth, for example in U.S. application Serial No. 09/776,191 (SEQ ID Nos. 1-12, 49, 50 and 61-72 therein, published as International PCT application No. WO 01/57194). The term also encompass

-15-

MTSPs with amino acid substitutions that do not substantially alter activity of each member, and also encompasses splice variants thereof. Suitable substitutions, including, although not necessarily, conservative substitutions of amino acids, are known to those of skill in this art and can be made without 5 eliminating the biological activity, such as the catalytic activity, of the resulting molecule.

As used herein, a "protease domain of a CVSP" refers to a domain of CVSP that exhibits proteolytic activity and shares homology and structural features with the chymotrypsin/trypsin family protease domains. Hence it is at 10 least the minimal portion of the domain that exhibits proteolytic activity as assessed by standard *in vitro* assays. Those of skill in this art recognize that such protease domain is the portion of the protease that is structurally equivalent to the trypsin or chymotrypsin fold. Contemplated herein are such protease domains and catalytically active portions thereof. Also provided are truncated 15 forms of the protease domain that include the smallest fragment thereof that acts catalytically as a single chain form.

As used herein, the catalytically active domain of a CVSP refers to the protease domain. Reference to the protease domain of a CVSP includes refers to the single chain form of the protein. If the two-chain form or both is intended, it 20 is so-specified. The zymogen form of each protein is a single chain, which is converted to the active two chain form by activation cleavage.

As used herein a protease domain of a CVSP14, whenever referenced herein, includes at least one or all of or any combination of or a catalytically active portion of:

25 a polypeptide encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5;

 a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of low, moderate or high stringency to the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5;

30 a polypeptide that comprises the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6;

-16-

a polypeptide that comprises a sequence of amino acids having at least about 60%, 70%, 80%, 90% or about 95% sequence identity with the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6; and/or

a protease domain of a splice variant of the CVSP14.

5 The CVSP14 can be from any animal, particularly a mammal, and includes but are not limited to, humans, rodents, fowl, ruminants and other animals. The full length zymogen or two-chain activated form is contemplated or any domain thereof, including the protease domain, which can be a two-chain activated form, or a single chain form.

10 By active form is meant a form active *in vivo* and/or *in vitro*. As described herein, the protease domain also can exist as a two-chain form. It is shown herein that, at least *in vitro*, the single chain forms of the SPs and the catalytic domains or proteolytically active portions thereof (typically C-terminal truncations) thereof exhibit protease activity. Hence provided herein are isolated

15 single chain forms of the protease domains of SPs and their use in *in vitro* drug screening assays for identification of agents that modulate the activity thereof.

As used herein, activation cleavage refers to the cleavage of the protease at the N-terminus of the protease domain (in this instance between R₅₅ and I₅₆; with reference to SEQ ID Nos. 12 and 13). By virtue of the Cys-Cys pairing

20 between the a Cys outside the protease domain (in this instance C₃₇) and a Cys in the protease domain (in this instance Cys₁₆₉), upon cleavage the resulting polypeptide has two chains ("A" chain and the "B" chain, which is the protease domain). Cleavage can be effected by another protease or autocatalytically.

As used herein, a two-chain form of the protease domain refers to a two-

25 chain form that is formed from the two-chain form of the protease in which the Cys pairing between, in this instance, Cys₃₇ and Cys₁₆₉, which links the protease domain to the remainder of the polypeptide, the "A" chain. A two chain protease domain form refers to any form in which the "remainder of the polypeptide", *i.e.*, "A" chain, is shortened and includes at least up to Cys₃₇.

30 As used herein a CVSP14, whenever referenced herein, includes at least one or all of or any combination of:

-17-

a polypeptide encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 12;
a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of low, moderate or high stringency to the sequence 5 of nucleotides set forth in SEQ ID No. 12;
a polypeptide that comprises the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 13;
a polypeptide that comprises a sequence of amino acids having at least about 60%, 70%, 80%, 90% or about 95% sequence identity with the 10 sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 or 13; and/or a splice variant of the CVSP14.

The CVSP14 polypeptide includes the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 13. Smaller portions thereof that retain protease activity are contemplated. The protease domain thereof is set forth in SEQ ID No. 6. The 15 protease domains of CVSPs vary in size and constitution, including insertions and deletions in surface loops. They retain conserved structure, including at least one of the active site triad, primary specificity pocket, oxyanion hole and/or other features of serine protease domains of proteases. Thus, for purposes herein, the protease domain is a portion of a CVSP, as defined herein, 20 and is homologous to a domain of other CVSP. As with the larger class of enzymes of the chymotrypsin (S1) fold (see, e.g., Internet accessible MEROPS data base), the CVSPs protease domains share a high degree of amino acid sequence identity. The His, Asp and Ser residues necessary for activity are present in conserved motifs. The activation site, whose cleavage creates the N- 25 terminus of protease domain in the two-chain forms has a conserved motif and readily can be identified.

CVSPs of interest include those that are activated and/or expressed in tumor cells at different levels, typically higher, from non-tumor cells; and those from cells in which substrates therefor differ in tumor cells from non-tumor cells 30 or differ with respect to substrates, co-factors or receptors, or otherwise alter the activity or specificity of the CVSP.

-18-

As used herein, a human protein is one encoded by nucleic acid, such as DNA, present in the genome of a human, including all allelic variants and conservative variations as long as they are not variants found in other mammals.

As used herein, a "nucleic acid encoding a protease domain or 5 catalytically active portion of a SP" shall be construed as referring to a nucleic acid encoding only the recited single chain protease domain or active portion thereof, and not the other contiguous portions of the SP as a continuous sequence.

As used herein, catalytic activity refers to the activity of the SP as a 10 serine protease. Function of the SP refers to its function in tumor biology, including promotion of or involvement in initiation, growth or progression of tumors, and also roles in signal transduction. Catalytic activity refers to the activity of the SP as a protease as assessed in *in vitro* proteolytic assays that detect proteolysis of a selected substrate.

15 As used herein, a zymogen is an inactive precursor of a proteolytic enzyme. Such precursors are generally larger, although not necessarily larger than the active form. With reference serine proteases zymogens are converted to active enzymes by specific cleavage, including catalytic and autocatalytic cleavage, or binding of an activating co-factor, which generates the mature 20 active enzyme. A zymogen, thus, is an enzymatically inactive protein that is converted to proteolytic enzyme by the action of an activator.

As used herein, "disease or disorder" refers to a pathological condition in an organism resulting from, *e.g.*, infection or genetic defect, and characterized by identifiable symptoms.

25 As used herein, neoplasm (neoplasia) refers to abnormal new growth, and thus means the same as *tumor*, which can be benign or malignant. Unlike *hyperplasia*, neoplastic proliferation persists even in the absence of the original stimulus.

As used herein, neoplastic disease refers to any disorder involving cancer, 30 including tumor development, growth, metastasis and progression.

As used herein, cancer refers to a general term for diseases caused by any type of malignant tumor.

-19-

As used herein, malignant, as applies to tumors, refers to primary tumors that have the capacity of *metastasis* with loss of *growth control* and *positional control*.

As used herein, an anti-cancer agent (used interchangeable with "anti-tumor or anti-neoplastic agent") refers to any agents used in the anti-cancer treatment. These include any agents, when used alone or in combination with other compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with neoplastic disease, tumor and cancer, and can be used in methods, combinations and compositions provided herein. Non-limiting examples of anti-neoplastic agents include anti-angiogenic agents, alkylating agents, antimetabolite, certain natural products, platinum coordination complexes, anthracenediones, substituted ureas, methylhydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, certain hormones, antagonists and anti-cancer polysaccharides.

As used herein, a splice variant refers to a variant produced by differential processing of a primary transcript of genomic nucleic acid, such as DNA, that results in more than one type of mRNA. Splice variants of SPs are provided herein.

As used herein, angiogenesis is intended to broadly encompass the totality of processes directly or indirectly involved in the establishment and maintenance of new vasculature (neovascularization), including, but not limited to, neovascularization associated with tumors.

As used herein, anti-angiogenic treatment or agent refers to any therapeutic regimen and compound, when used alone or in combination with other treatment or compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with undesired and/or uncontrolled angiogenesis. Thus, for purposes herein an anti-angiogenic agent refers to an agent that inhibits the establishment or maintenance of vasculature. Such agents include, but are not limited to, anti-tumor agents, and agents for treatments of other disorders.

-20-

associated with undesirable angiogenesis, such as diabetic retinopathies, restenosis, hyperproliferative disorders and others.

As used herein, non-anti-angiogenic anti-tumor agents refer to anti-tumor agents that do not act primarily by inhibiting angiogenesis.

5 As used herein, pro-angiogenic agents are agents that promote the establishment or maintenance of the vasculature. Such agents include agents for treating cardiovascular disorders, including heart attacks and strokes.

As used herein, undesired and/or uncontrolled angiogenesis refers to pathological angiogenesis wherein the influence of angiogenesis stimulators 10 outweighs the influence of angiogenesis inhibitors. As used herein, deficient angiogenesis refers to pathological angiogenesis associated with disorders where there is a defect in normal angiogenesis resulting in aberrant angiogenesis or an absence or substantial reduction in angiogenesis.

As used herein, the protease domain of an SP protein refers to the 15 protease domain of an SP that exhibits proteolytic activity. Hence it is at least the minimal portion of the protein that exhibits proteolytic activity as assessed by standard assays *in vitro*. It refers, herein, to a single chain form and also the two chain activated form (where the two chain form is intended it will be so-noted). Exemplary protease domains include at least a sufficient portion of 20 sequences of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 (encoded by nucleotides in SEQ ID No. 5) to exhibit protease activity.

Also contemplated are nucleic acid molecules that encode a polypeptide that has proteolytic activity in an *in vitro* proteolysis assay and that have at least 60%, 70%, 80%, 90% or about 95% sequence identity with the full length of a 25 protease domain of a CVSP14 polypeptide, or that hybridize along their full length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full length to a nucleic acids that encode a protease domain, particularly under conditions of moderate, generally high, stringency.

For the protease domains, residues at the N-terminus can be critical for 30 activity. It is shown herein that the protease domain of the single chain form of the CVSP14 protease is catalytically active. Hence the protease domain generally requires the N-terminal amino acids thereof for activity; the C-terminus

-21-

portion can be truncated. The amount that can be removed can be determined empirically by testing the polypeptide for protease activity in an *in vitro* assay that assesses catalytic cleavage.

Hence smaller portions of the protease domains, particularly the single 5 chain domains, thereof that retain protease activity are contemplated. Such smaller versions generally are C-terminal truncated versions of the protease domains. The protease domains vary in size and constitution, including insertions and deletions in surface loops. Such domains exhibit conserved 10 structure, including at least one structural feature, such as the active site triad, primary specificity pocket, oxyanion hole and/or other features of serine protease domains of proteases. Thus, for purposes herein, the protease domain is a single chain portion of a CVSP14, as defined herein, but is homologous in its structural features and retention of sequence of similarity or homology the 15 protease domain of chymotrypsin or trypsin. The polypeptide exhibits proteolytic activity as a single chain.

As used herein, by homologous means about greater than 25% nucleic acid sequence identity, such as 25% 40%, 60%, 70%, 80%, 90% or 95%. If necessary the percentage homology will be specified. The terms "homology" and "identity" are often used interchangeably. In general, sequences are aligned 20 so that the highest order match is obtained (see, e.g.: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence 25 Analysis in Molecular Biology*, von Heijne, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). By sequence identity, the number of conserved amino acids are determined by standard alignment algorithm programs, and are used with default gap penalties 30 established by each supplier. Substantially homologous nucleic acid molecules would hybridize typically at moderate stringency or at high stringency all along the length of the nucleic acid or at least about 70%, 80% or 90% of

-22-

the full length nucleic acid molecule of interest. Also contemplated are nucleic acid molecules that contain degenerate codons in place of codons in the hybridizing nucleic acid molecule.

Whether any two nucleic acid molecules have nucleotide sequences that 5 are at least 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% "identical" can be determined using known computer algorithms such as the "FAST A" program, using for example, the default parameters as in Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (other programs include the GCG program package (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12(II):387 (1984)), BLASTP, 10 BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., *et al.*, *J Molec Biol* 215:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo *et al.* (1988) *SIAM J Applied Math* 48:1073). For example, the BLAST function of the National Center for Biotechnology Information database can be used to determine identity. Other commercially or publicly available programs 15 include, DNASTar "MegAlign" program (Madison, WI) and the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) "Gap" program (Madison WI)). Percent homology or identity of proteins and/or nucleic acid molecules can be determined, for example, by comparing sequence information using a GAP computer program (e.g., Needleman *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, as 20 revised by Smith and Waterman ((1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482). Briefly, the GAP program defines similarity as the number of aligned symbols (i.e., nucleotides or amino acids) which are similar, divided by the total number of symbols in the shorter of the two sequences. Default parameters for the GAP program can include: (1) a unary comparison matrix (containing a value of 1 for 25 identities and 0 for non-identities) and the weighted comparison matrix of Gribskov *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:6745, as described by Schwartz and Dayhoff, eds., *ATLAS OF PROTEIN 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 30 penalty for end gaps. Therefore, as used herein, the term "identity" represents a comparison between a test and a reference polypeptide or polynucleotide.

-23-

As used herein, the term at least "90% identical to" refers to percent identities from 90 to 99.99 relative to the reference polypeptides. Identity at a level of 90% or more is indicative of the fact that, assuming for exemplification purposes a test and reference polynucleotide length of 100 amino acids are compared. No more than 10% (i.e., 10 out of 100) amino acids in the test polypeptide differs from that of the reference polypeptides. Similar comparisons can be made between a test and reference polynucleotides. Such differences can be represented as point mutations randomly distributed over the entire length of an amino acid sequence or they can be clustered in one or more locations of varying length up to the maximum allowable, e.g. 10/100 amino acid difference (approximately 90% identity). Differences are defined as nucleic acid or amino acid substitutions, or deletions. At the level of homologies or identities above about 85-90%, the result should be independent of the program and gap parameters set; such high levels of identity can be assessed readily, often without relying on software.

As used herein, primer refers to an oligonucleotide containing two or more deoxyribonucleotides or ribonucleotides, typically more than three, from which synthesis of a primer extension product can be initiated. Experimental conditions conducive to synthesis include the presence of nucleoside triphosphates and an agent for polymerization and extension, such as DNA polymerase, and a suitable buffer, temperature and pH.

As used herein, animals include any animal, such as, but are not limited to, goats, cows, deer, sheep, rodents, pigs and humans. Non-human animals, exclude humans as the contemplated animal. The SPs provided herein are from any source, animal, plant, prokaryotic and fungal. Most CVSP14s are of animal origin, including mammalian origin.

As used herein, genetic therapy involves the transfer of heterologous nucleic acid, such as DNA, into certain cells, target cells, of a mammal, particularly a human, with a disorder or conditions for which such therapy is sought. The nucleic acid, such as DNA, is introduced into the selected target cells in a manner such that the heterologous nucleic acid, such as DNA, is expressed and a therapeutic product encoded thereby is produced.

-24-

Alternatively, the heterologous nucleic acid, such as DNA, can in some manner mediate expression of DNA that encodes the therapeutic product, or it can encode a product, such as a peptide or RNA that in some manner mediates, directly or indirectly, expression of a therapeutic product. Genetic therapy can 5 also be used to deliver nucleic acid encoding a gene product that replaces a defective gene or supplements a gene product produced by the mammal or the cell in which it is introduced. The introduced nucleic acid can encode a therapeutic compound, such as a growth factor inhibitor thereof, or a tumor necrosis factor or inhibitor thereof, such as a receptor therefor, that is not 10 normally produced in the mammalian host or that is not produced in therapeutically effective amounts or at a therapeutically useful time. The heterologous nucleic acid, such as DNA, encoding the therapeutic product can be modified prior to introduction into the cells of the afflicted host in order to enhance or otherwise alter the product or expression thereof. Genetic therapy 15 can also involve delivery of an inhibitor or repressor or other modulator of gene expression.

As used herein, heterologous nucleic acid is nucleic acid that (if DNA encodes RNA) and proteins that are not normally produced *in vivo* by the cell in which it is expressed or that mediates or encodes mediators that alter expression 20 of endogenous nucleic acid, such as DNA, by affecting transcription, translation, or other regulatable biochemical processes. Heterologous nucleic acid, such as DNA, can also be referred to as foreign nucleic acid, such as DNA. Any nucleic acid, such as DNA, that one of skill in the art would recognize or consider as heterologous or foreign to the cell in which it is expressed is herein encompassed 25 by heterologous nucleic acid; heterologous nucleic acid includes exogenously added nucleic acid that is also expressed endogenously. Examples of heterologous nucleic acid include, but are not limited to, nucleic acid that encodes traceable marker proteins, such as a protein that confers drug resistance, nucleic acid that encodes therapeutically effective substances, such 30 as anti-cancer agents, enzymes and hormones, and nucleic acid, such as DNA, that encodes other types of proteins, such as antibodies. Antibodies that are encoded by heterologous nucleic acid can be secreted or expressed on the

-25-

surface of the cell in which the heterologous nucleic acid has been introduced. Heterologous nucleic acid is generally not endogenous to the cell into which it is introduced, but has been obtained from another cell or prepared synthetically.

Generally, although not necessarily, such nucleic acid encodes RNA and proteins that are not normally produced by the cell in which it is expressed.

Hence, herein heterologous nucleic acid or foreign nucleic acid, includes a nucleic acid molecule not present in the exact orientation or position as the counterpart nucleic acid molecule, such as DNA, found in the genome. It can also refer to a nucleic acid molecule from another organism or species (*i.e.*, 10 exogenous).

As used herein, a therapeutically effective product is a product that is encoded by heterologous nucleic acid, typically DNA, that, upon introduction of the nucleic acid into a host, a product is expressed that ameliorates or eliminates the symptoms, manifestations of an inherited or acquired disease or that cures 15 the disease.

As used herein, recitation that a polypeptide consists essentially of the protease domain means that the only SP portion of the polypeptide is a protease domain or a catalytically active portion thereof. The polypeptide can optionally, and generally will, include additional non-SP-derived sequences of amino acids.

20 As used herein, cancer or tumor treatment or agent refers to any therapeutic regimen and/or compound that, when used alone or in combination with other treatments or compounds, can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with deficient angiogenesis.

25 As used herein, domain refers to a portion of a molecule, *e.g.*, proteins or the encoding nucleic acids, that is structurally and/or functionally distinct from other portions of the molecule.

As used herein, protease refers to an enzyme catalyzing hydrolysis of proteins or peptides. It includes the zymogen form and activated forms thereof.

30 For clarity reference to protease refers to all forms, and particular forms will be specifically designated. For purposes herein, the protease domain includes single

-26-

and two chain forms of the protease domain of an SP protein. For CVSP14 the protease domain also includes two chain forms of the protease domain.

As used herein, nucleic acids include DNA, RNA and analogs thereof, including protein nucleic acids (PNA) and mixture thereof. Nucleic acids can be 5 single or double-stranded. When referring to probes or primers, optionally labeled, with a detectable label, such as a fluorescent or radiolabel, single-stranded molecules are contemplated. Such molecules are typically of a length such that their target is statistically unique or of low copy number (typically less than 5, generally less than 3) for probing or priming a library. Generally a probe 10 or primer contains at least 14, 16 or 30 contiguous of sequence complementary to or identical a gene of interest. Probes and primers can be 10, 20, 30, 50, 100 or more nucleic acids long.

As used herein, nucleic acid encoding a fragment or portion of an SP refers to a nucleic acid encoding only the recited fragment or portion of SP, and 15 not the other contiguous portions of the SP.

As used herein, operative linkage of heterologous nucleic to regulatory and effector sequences of nucleotides, such as promoters, enhancers, transcriptional and translational stop sites, and other signal sequences refers to the relationship between such nucleic acid, such as DNA, and such sequences of 20 nucleotides. For example, operative linkage of heterologous DNA to a promoter refers to the physical relationship between the DNA and the promoter such that the transcription of such DNA is initiated from the promoter by an RNA polymerase that specifically recognizes, binds to and transcribes the DNA in reading frame. Thus, operatively linked or operationally associated refers to the 25 functional relationship of nucleic acid, such as DNA, with regulatory and effector sequences of nucleotides, such as promoters, enhancers, transcriptional and translational stop sites, and other signal sequences. For example, operative linkage of DNA to a promoter refers to the physical and functional relationship between the DNA and the promoter such that the transcription of such DNA is 30 initiated from the promoter by an RNA polymerase that specifically recognizes, binds to and transcribes the DNA. In order to optimize expression and/or *in vitro* transcription, it can be necessary to remove, add or alter 5' untranslated portions

of the clones to eliminate extra, potential inappropriate alternative translation initiation (*i.e.*, start) codons or other sequences that can interfere with or reduce expression, either at the level of transcription or translation. Alternatively, consensus ribosome binding sites (see, *e.g.*, Kozak *J. Biol. Chem.* 266:19867-5 19870 (1991)) can be inserted immediately 5' of the start codon and can enhance expression. The desirability of (or need for) such modification can be empirically determined.

As used herein, a sequence complementary to at least a portion of an RNA, with reference to antisense oligonucleotides, means a sequence having 10 sufficient complementarity to be able to hybridize with the RNA, generally under moderate or high stringency conditions, forming a stable duplex; in the case of double-stranded SP antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA (or dsRNA) can thus be tested, or triplex formation can be assayed. The ability to hybridize depends on the degree of complementarity and the length of the 15 antisense nucleic acid. Generally, the longer the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with a SP encoding RNA it can contain and still form a stable duplex (or triplex, as the case can be). One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

20 For purposes herein, amino acid substitutions can be made in any of SPs and protease domains thereof provided that the resulting protein exhibits protease activity. Muteins can be made by making conservative amino acid substitutions and also non-conservative amino acid substitutions. For example, amino acid substitutions that desirably alter properties of the proteins can be 25 made. In one embodiment, mutations that prevent degradation of the polypeptide can be made. Many proteases cleave after basic residues, such as R and K; to eliminate such cleavage, the basic residue is replaced with a non-basic residue. Interaction of the protease with an inhibitor can be blocked while retaining catalytic activity by effecting a non-conservative change at the site 30 interaction of the inhibitor with the protease. Receptor binding can be altered without altering catalytic activity.

-28-

Amino acid substitutions contemplated include conservative substitutions, such as those set forth in Table 1, which do not eliminate proteolytic activity. As described herein, substitutions that alter properties of the proteins, such as removal of cleavage sites and other such sites are also contemplated; such 5 substitutions are generally non-conservative, but can be readily effected by those of skill in the art.

Suitable conservative substitutions of amino acids are known to those of skill in this art and can be made generally without altering the biological activity, for example enzymatic activity, of the resulting molecule. Those of skill in this 10 art recognize that, in general, single amino acid substitutions in non-essential regions of a polypeptide do not substantially alter biological activity (see, e.g., Watson *et al.* *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p.224). Also included within the definition, is the 15 catalytically active fragment of an SP, particularly a single chain protease portion. Conservative amino acid substitutions are made, for example, in accordance with those set forth in TABLE 1 as follows:

TABLE 1

	Original residue	Conservative substitution
20	Ala (A)	Gly; Ser, Abu
	Arg (R)	Lys, orn
	Asn (N)	Gln; His
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
25	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
30	Ornithine	Lys; Arg
	Phe (F)	Met; Leu; Tyr
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe
35	Val (V)	Ile; Leu; Met; Nle; Nv
		Other substitutions are also permissible and can be determined empirically or in accord with known conservative substitutions.

-29-

As used herein, Abu is 2-aminobutyric acid; Orn is ornithine.

As used herein, the amino acids, which occur in the various amino acid sequences appearing herein, are identified according to their well-known, three-letter or one-letter abbreviations. The nucleotides, which occur in the various 5 DNA fragments, are designated with the standard single-letter designations used routinely in the art.

As used herein, a probe or primer based on a nucleotide sequence disclosed herein, includes at least 10, 14, typically at least 16 contiguous sequence of nucleotides of SEQ ID No. 5, and probes of at least 30, 50 or 100 10 contiguous sequence of nucleotides of SEQ ID No. 5. The length of the probe or primer for unique hybridization is a function of the complexity of the genome of interest.

As used herein, amelioration of the symptoms of a particular disorder by administration of a particular pharmaceutical composition refers to any lessening, 15 whether permanent or temporary, lasting or transient that can be attributed to or associated with administration of the composition.

As used herein, antisense polynucleotides refer to synthetic sequences of nucleotide bases complementary to mRNA or the sense strand of double-stranded DNA. Admixture of sense and antisense polynucleotides under 20 appropriate conditions leads to the binding of the two molecules, or hybridization. When these polynucleotides bind to (hybridize with) mRNA, inhibition of protein synthesis (translation) occurs. When these polynucleotides bind to double-stranded DNA, inhibition of RNA synthesis (transcription) occurs. The resulting inhibition of translation and/or transcription leads to an inhibition of 25 the synthesis of the protein encoded by the sense strand. Antisense nucleic acid molecule typically contain a sufficient number of nucleotides to specifically bind to a target nucleic acid, generally at least 5 contiguous nucleotides, often at least 14 or 16 or 30 contiguous nucleotides or modified nucleotides complementary to the coding portion of a nucleic acid molecule that encodes a 30 gene of interest, for example, nucleic acid encoding a single chain protease domain of an SP.

-30-

As used herein, an array refers to a collection of elements, such as antibodies, containing three or more members. An addressable array is one in which the members of the array are identifiable, typically by position on a solid phase support. Hence, in general the members of the array are immobilized on discrete identifiable loci on the surface of a solid phase.

As used herein, antibody refers to an immunoglobulin, whether natural or partially or wholly synthetically produced, including any derivative thereof that retains the specific binding ability the antibody. Hence antibody includes any protein having a binding domain that is homologous or substantially homologous to an immunoglobulin binding domain. Antibodies include members of any immunoglobulin claims, including IgG, IgM, IgA, IgD and IgE.

As used herein, antibody fragment refers to any derivative of an antibody that is less than full length, retaining at least a portion of the full-length antibody's specific binding ability. Examples of antibody fragments include, but 15 are not limited to, Fab, Fab', F(ab)₂, single-chain Fvs (scFV), FV, dsFV diabody and Fd fragments. The fragment can include multiple chains linked together, such as by disulfide bridges. An antibody fragment generally contains at least about 50 amino acids and typically at least 200 amino acids.

As used herein, an Fv antibody fragment is composed of one variable 20 heavy domain (V_H) and one variable light domain linked by noncovalent interactions.

As used herein, a dsFV refers to an Fv with an engineered intermolecular disulfide bond, which stabilizes the V_HV_L pair.

As used herein, an F(ab)₂ fragment is an antibody fragment that results 25 from digestion of an immunoglobulin with pepsin at pH 4.0-4.5; it can be recombinantly produced to produce the equivalent fragment.

As used herein, Fab fragments is an antibody fragment that results from digestion of an immunoglobulin with papain; it can be recombinantly produced to produce the equivalent fragment.

30 As used herein, scFVs refer to antibody fragments that contain a variable light chain (V_L) and variable heavy chain (V_H) covalently connected by a polypeptide linker in any order. The linker is of a length such that the two

-31-

variable domains are bridged without substantial interference. Included linkers are (Gly-Ser)_n residues with some Glu or Lys residues dispersed throughout to increase solubility.

As used herein, humanized antibodies refer to antibodies that are 5 modified to include human sequences of amino acids so that administration to a human does not provoke an immune response. Methods for preparation of such antibodies are known. For example, the hybridoma that expresses the monoclonal antibody is altered by recombinant DNA techniques to express an antibody in which the amino acid composition of the non-variable regions is 10 based on human antibodies. Computer programs have been designed to identify such regions.

As used herein, diabodies are dimeric scFV; diabodies typically have shorter peptide linkers than scFvs, and they generally dimerize.

As used herein, production by recombinant means by using recombinant 15 DNA methods means the use of the well known methods of molecular biology for expressing proteins encoded by cloned DNA.

As used herein the term assessing is intended to include 20 quantitative and qualitative determination in the sense of obtaining an absolute value for the activity of an SP, or a domain thereof, present in the sample, and also of obtaining an index, ratio, percentage, visual or other value indicative of the level of the activity. Assessment can be direct or indirect and the chemical species actually detected need not of course be the proteolysis product itself but can for example be a derivative thereof or some further substance.

25 As used herein, biological activity refers to the *in vivo* activities of a compound or physiological responses that result upon *in vivo* administration of a compound, composition or other mixture. Biological activity, thus, encompasses therapeutic effects and pharmaceutical activity of such compounds, compositions and mixtures. Biological activities can be observed in *in vitro* 30 systems designed to test or use such activities. Thus, for purposes herein the biological activity of a luciferase is its oxygenase activity whereby, upon oxidation of a substrate, light is produced.

-32-

As used herein, functional activity refers to a polypeptide or portion thereof that displays one or more activities associated with a full-length (complete) protein. Functional activities include, but are not limited to, biological activity, catalytic or enzymatic activity, antigenicity (ability to bind to or compete 5 with a polypeptide for binding to an anti-polypeptide antibody), immunogenicity, ability to form multimers, the ability to specifically bind to a receptor or ligand for the polypeptide.

As used herein, a conjugate refers to the compounds provided herein that include one or more SPs, including a CVSP14, particularly single chain protease 10 domains thereof, and one or more targeting agents. These conjugates include those produced by recombinant means as fusion proteins, those produced by chemical means, such as by chemical coupling, through, for example, coupling to sulphydryl groups, and those produced by any other method whereby at least one SP, or a domain thereof, is linked, directly or indirectly via linker(s) to a 15 targeting agent.

As used herein, a targeting agent, is any moiety, such as a protein or effective portion thereof, that provides specific binding of the conjugate to a cell surface receptor, which, can internalize the conjugate or SP portion thereof. A targeting agent can also be one that promotes or facilitates, for example, affinity 20 isolation or purification of the conjugate; attachment of the conjugate to a surface; or detection of the conjugate or complexes containing the conjugate.

As used herein, an antibody conjugate refers to a conjugate in which the targeting agent is an antibody.

As used herein, derivative or analog of a molecule refers to a portion 25 derived from or a modified version of the molecule.

As used herein, an effective amount of a compound for treating a particular disease is an amount that is sufficient to ameliorate, or in some manner reduce the symptoms associated with the disease. Such amount can be administered as a single dosage or can be administered according to a regimen, 30 whereby it is effective. The amount can cure the disease but, typically, is administered in order to ameliorate the symptoms of the disease. Repeated administration can be required to achieve the desired amelioration of symptoms.

-33-

As used herein equivalent, when referring to two sequences of nucleic acids means that the two sequences in question encode the same sequence of amino acids or equivalent proteins. When equivalent is used in referring to two proteins or peptides, it means that the two proteins or peptides have

- 5 substantially the same amino acid sequence with only amino acid substitutions (such, as but not limited to, conservative changes such as those set forth in Table 1, above) that do not substantially alter the activity or function of the protein or peptide. When equivalent refers to a property, the property does not need to be present to the same extent (e.g., two peptides can exhibit different
- 10 rates of the same type of enzymatic activity), but the activities are usually substantially the same. Complementary, when referring to two nucleotide sequences, means that the two sequences of nucleotides are capable of hybridizing, typically with less than 25%, 15%, 5% or 0% mismatches between opposed nucleotides. If necessary the percentage of complementarity will be
- 15 specified. Typically the two molecules are selected such that they will hybridize under conditions of high stringency.

As used herein, an agent that modulates the activity of a protein or expression of a gene or nucleic acid either decreases or increases or otherwise alters the activity of the protein or, in some manner up- or down-regulates or

- 20 otherwise alters expression of the nucleic acid in a cell.

As used herein, inhibitor of the activity of an SP encompasses any substances that prohibit or decrease production, post-translational modification(s), maturation, or membrane localization of the SP or any substances that interferes with or decreases the proteolytic efficacy of thereof,

- 25 particularly of a single chain form in an *in vitro* screening assay.

As used herein, a method for treating or preventing neoplastic disease means that any of the symptoms, such as the tumor, metastasis thereof, the vascularization of the tumors or other parameters by which the disease is characterized are reduced, ameliorated, prevented, placed in a state of remission, or maintained in a state of remission. It also means that the hallmarks of

- 30 neoplastic disease and metastasis can be eliminated, reduced or prevented by the treatment. Non-limiting examples of the hallmarks include uncontrolled

-34-

degradation of the basement membrane and proximal extracellular matrix, migration, division, and organization of the endothelial cells into new functioning capillaries, and the persistence of such functioning capillaries.

As used herein, pharmaceutically acceptable salts, esters or other derivatives of the conjugates include any salts, esters or derivatives that can be readily prepared by those of skill in this art using known methods for such derivatization and that produce compounds that can be administered to animals or humans without substantial toxic effects and that either are pharmaceutically active or are prodrugs.

10 As used herein, a prodrug is a compound that, upon *in vivo* administration, is metabolized or otherwise converted to the biologically, pharmaceutically or therapeutically active form of the compound. To produce a prodrug, the pharmaceutically active compound is modified such that the active compound is regenerated by metabolic processes. The prodrug can be designed
15 to alter the metabolic stability or the transport characteristics of a drug, to mask side effects or toxicity, to improve the flavor of a drug or to alter other characteristics or properties of a drug. By virtue of knowledge of pharmacodynamic processes and drug metabolism *in vivo*, those of skill in this art, once a pharmaceutically active compound is known, can design prodrugs of
20 the compound (see, e.g., Nogradi (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

As used herein, a drug identified by the screening methods provided herein refers to any compound that is a candidate for use as a therapeutic or as a lead compound for the design of a therapeutic. Such compounds can be small
25 molecules, including small organic molecules, peptides, peptide mimetics, antisense molecules or dsRNA, such as RNAi, antibodies, fragments of antibodies, recombinant antibodies and other such compound which can serve as drug candidate or lead compound.

As used herein, a peptidomimetic is a compound that mimics the
30 conformation and certain stereochemical features of the biologically active form of a particular peptide. In general, peptidomimetics are designed to mimic certain desirable properties of a compound, but not the undesirable properties,

-35-

such as flexibility, that lead to a loss of a biologically active conformation and bond breakdown. Peptidomimetics may be prepared from biologically active compounds by replacing certain groups or bonds that contribute to the undesirable properties with bioisosteres. Bioisosteres are known to those of skill in the art. For example the methylene bioisostere CH_2S has been used as an amide replacement in enkephalin analogs (see, e.g., Spatola (1983) pp. 267-357 in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, Weinstein, Ed. volume 7, Marcel Dekker, New York). Morphine, which can be administered orally, is a compound that is a peptidomimetic of the peptide endorphin. For purposes herein, cyclic peptides are included among peptidomimetics.

As used herein, a promoter region or promoter element refers to a segment of DNA or RNA that controls transcription of the DNA or RNA to which it is operatively linked. The promoter region includes specific sequences that are sufficient for RNA polymerase recognition, binding and transcription initiation. This portion of the promoter region is referred to as the promoter. In addition, the promoter region includes sequences that modulate this recognition, binding and transcription initiation activity of RNA polymerase. These sequences can be *cis* acting or can be responsive to *trans* acting factors. Promoters, depending upon the nature of the regulation, can be constitutive or regulated. Exemplary promoters contemplated for use in prokaryotes include the bacteriophage T7 and T3 promoters.

As used herein, a receptor refers to a molecule that has an affinity for a given ligand. Receptors can be naturally-occurring or synthetic molecules. Receptors can also be referred to in the art as anti-ligands. As used herein, the receptor and anti-ligand are interchangeable. Receptors can be used in their unaltered state or as aggregates with other species. Receptors can be attached, covalently or noncovalently, or in physical contact with, to a binding member, either directly or indirectly via a specific binding substance or linker. Examples of receptors, include, but are not limited to: antibodies, cell membrane receptors surface receptors and internalizing receptors, monoclonal antibodies and antisera reactive with specific antigenic determinants [such as on viruses, cells, or other

-36-

materials], drugs, polynucleotides, nucleic acids, peptides, cofactors, lectins, sugars, polysaccharides, cells, cellular membranes, and organelles.

Examples of receptors and applications using such receptors, include but are not restricted to:

- 5 a) enzymes: specific transport proteins or enzymes essential to survival of microorganisms, which could serve as targets for antibiotic [ligand] selection;
- b) antibodies: identification of a ligand-binding site on the antibody molecule that combines with the epitope of an antigen of interest can be investigated; determination of a sequence that mimics an antigenic epitope can
- 10 lead to the development of vaccines of which the immunogen is based on one or more of such sequences or lead to the development of related diagnostic agents or compounds useful in therapeutic treatments such as for auto-immune diseases
- c) nucleic acids: identification of ligand, such as protein or RNA, binding sites;
- 15 d) catalytic polypeptides: polymers, including polypeptides, that are capable of promoting a chemical reaction involving the conversion of one or more reactants to one or more products; such polypeptides generally include a binding site specific for at least one reactant or reaction intermediate and an active functionality proximate to the binding site, in which the functionality is
- 20 capable of chemically modifying the bound reactant (see, e.g., U.S. Patent No. 5,215,899);
- e) hormone receptors: determination of the ligands that bind with high affinity to a receptor is useful in the development of hormone replacement therapies; for example, identification of ligands that bind to such receptors can
- 25 lead to the development of drugs to control blood pressure; and
- f) opiate receptors: determination of ligands that bind to the opiate receptors in the brain is useful in the development of less-addictive replacements for morphine and related drugs.

As used herein, sample refers to anything which can contain an analyte for which an analyte assay is desired. The sample can be a biological sample, such as a biological fluid or a biological tissue. Examples of biological fluids include urine, blood, plasma, serum, saliva, semen, stool, sputum, cerebral spinal

-37-

fluid, tears, mucus, amniotic fluid or the like. Biological tissues are aggregate of cells, usually of a particular kind together with their intercellular substance that form one of the structural materials of a human, animal, plant, bacterial, fungal or viral structure, including connective, epithelium, muscle and nerve tissues.

- 5 Examples of biological tissues also include organs, tumors, lymph nodes, arteries and individual cell(s).

As used herein: stringency of hybridization in determining percentage mismatch is as follows:

- 10 1) high stringency: 0.1 x SSPE, 0.1% SDS, 65°C
2) medium stringency: 0.2 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C
3) low stringency: 1.0 x SSPE, 0.1% SDS, 50°C

Those of skill in this art know that the washing step selects for stable hybrids and also know the ingredients of SSPE (see, e.g., Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, in: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), vol. 3, p. B.13, see, also, numerous catalogs that describe commonly used laboratory solutions). SSPE is pH 7.4 phosphate-buffered 0.18 NaCl. Further, those of skill in the art recognize that the stability of hybrids is determined by T_m , which is a function of the sodium ion concentration and temperature ($T_m = 81.5^\circ C \cdot 16.6(\log_{10}[Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/l$), so that the only parameters in the wash conditions critical to hybrid stability are sodium ion concentration in the SSPE (or SSC) and temperature.

It is understood that equivalent stringencies can be achieved using alternative buffers, salts and temperatures. By way of example and not limitation, procedures using conditions of low stringency are as follows (see also 25 Shilo and Weinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6789-6792 (1981)): Filters containing DNA are pretreated for 6 hours at 40°C in a solution containing 35% formamide, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.1% PVP, 0.1% Ficoll, 1% BSA, and 500 μ g/ml denatured salmon sperm DNA (10X SSC is 1.5 M sodium chloride, and 0.15 M sodium citrate, adjusted to a pH of 7).

30 Hybridizations are carried out in the same solution with the following modifications: 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100 μ g/ml salmon sperm DNA, 10% (wt/vol) dextran sulfate, and 5-20 $\times 10^6$ cpm ^{32}P -labeled probe is

-38-

used. Filters are incubated in hybridization mixture for 18-20 hours at 40°C, and then washed for 1.5 hours at 55°C in a solution containing 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.1% SDS. The wash solution is replaced with fresh solution and incubated an additional 1.5 hours at 60°C. Filters are 5 blotted dry and exposed for autoradiography. If necessary, filters are washed for a third time at 65-68°C and reexposed to film. Other conditions of low stringency which can be used are well known in the art (e.g., as employed for cross-species hybridizations).

By way of example and not way of limitation, procedures using 10 conditions of moderate stringency include, for example, but are not limited to, procedures using such conditions of moderate stringency are as follows: Filters containing DNA are pretreated for 6 hours at 55°C in a solution containing 6X SSC, 5X Denhart's solution, 0.5% SDS and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Hybridizations are carried out in the same solution and 5-20 X 10⁶ cpm 15 ³²P-labeled probe is used. Filters are incubated in hybridization mixture for 18-20 hours at 55°C, and then washed twice for 30 minutes at 60°C in a solution containing 1X SSC and 0.1% SDS. Filters are blotted dry and exposed for autoradiography. Other conditions of moderate stringency which can be used are well-known in the art. Washing of filters is done at 37°C for 1 hour in a 20 solution containing 2X SSC, 0.1% SDS.

By way of example and not way of limitation, procedures using conditions of high stringency are as follows: Prehybridization of filters containing DNA is carried out for 8 hours to overnight at 65°C in buffer composed of 6X SSC, 25 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, and 500 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Filters are hybridized for 48 hours 25 at 65°C in prehybridization mixture containing 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA and 5-20 X 10⁶ cpm of ³²P-labeled probe. Washing of filters is done at 37°C for 1 hour in a solution containing 2X SSC, 0.01% PVP, 0.01% Ficoll, and 0.01% BSA. This is followed by a wash in 0.1X SSC at 50°C for 45 30 minutes before autoradiography. Other conditions of high stringency which can be used are well known in the art.

-39-

The term substantially identical or homologous or similar varies with the context as understood by those skilled in the relevant art and generally means at least 60% or 70%, preferably means at least 80%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95% identity.

- 5 As used herein, substantially identical to a product means sufficiently similar so that the property of interest is sufficiently unchanged so that the substantially identical product can be used in place of the product.
- As used herein, substantially pure means sufficiently homogeneous to appear free of readily detectable impurities as determined by standard methods
- 10 of analysis, such as thin layer chromatography (TLC), gel electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC), used by those of skill in the art to assess such purity, or sufficiently pure such that further purification would not detectably alter the physical and chemical properties, such as enzymatic and biological activities, of the substance. Methods for purification of the
- 15 compounds to produce substantially chemically pure compounds are known to those of skill in the art. A substantially chemically pure compound can, however, be a mixture of stereoisomers or isomers. In such instances, further purification might increase the specific activity of the compound.
- As used herein, target cell refers to a cell that expresses an SP *in vivo*.
- 20 As used herein, test substance (or test compound) refers to a chemically defined compound (e.g., organic molecules, inorganic molecules, organic/inorganic molecules, proteins, peptides, nucleic acids, oligonucleotides, lipids, polysaccharides, saccharides, or hybrids among these molecules such as glycoproteins, etc.) or mixtures of compounds (e.g., a library of test compounds,
- 25 natural extracts or culture supernatants, etc.) whose effect on an SP, particularly a single chain form that includes the protease domain or a sufficient portion thereof for activity, as determined by an *in vitro* method, such as the assays provided herein.
- As used herein, the terms a therapeutic agent, therapeutic regimen,
- 30 radioprotectant, chemotherapeutic mean conventional drugs and drug therapies, including vaccines, which are known to those skilled in the art. Radiotherapeutic agents are well known in the art.

-40-

As used herein, treatment means any manner in which the symptoms of a condition, disorder or disease are ameliorated or otherwise beneficially altered.

Treatment also encompasses any pharmaceutical use of the compositions herein.

- As used herein, vector (or plasmid) refers to discrete elements that are used to introduce heterologous nucleic acid into cells for either expression or replication thereof. The vectors typically remain episomal, but can be designed to effect integration of a gene or portion thereof into a chromosome of the genome. Also contemplated are vectors that are artificial chromosomes, such as yeast artificial chromosomes and mammalian artificial chromosomes. Selection and use of such vehicles are well known to those of skill in the art. An expression vector includes vectors capable of expressing DNA that is operatively linked with regulatory sequences, such as promoter regions, that are capable of effecting expression of such DNA fragments. Thus, an expression vector refers to a recombinant DNA or RNA construct, such as a plasmid, a phage, a recombinant virus or other vector that, upon introduction into an appropriate host cell, results in expression of the cloned DNA. Appropriate expression vectors are well known to those of skill in the art and include those that are replicable in eukaryotic cells and/or prokaryotic cells and those that remain episomal or those which integrate into the host cell genome.
- As used herein, protein binding sequence refers to a protein or peptide sequence that is capable of specific binding to other protein or peptide sequences generally, to a set of protein or peptide sequences or to a particular protein or peptide sequence.
- As used herein, epitope tag refers to a short stretch of amino acid residues corresponding to an epitope to facilitate subsequent biochemical and immunological analysis of the epitope tagged protein or peptide. Epitope tagging is achieved by including the sequence of the epitope tag to the protein-encoding sequence in an appropriate expression vector. Epitope tagged proteins can be affinity purified using highly specific antibodies raised against the tags.
- As used herein, metal binding sequence refers to a protein or peptide sequence that is capable of specific binding to metal ions generally, to a set of metal ions or to a particular metal ion.

-41-

As used herein, a combination refers to any association between two or among more items.

As used herein, a composition refers to a any mixture. It can be a solution, a suspension, liquid, powder, a paste, aqueous, non-aqueous or any 5 combination thereof.

As used herein, fluid refers to any composition that can flow. Fluids thus encompass compositions that are in the form of semi-solids, pastes, solutions, aqueous mixtures, gels, lotions, creams and other such compositions.

As used herein, a cellular extract refers to a preparation or fraction which 10 is made from a lysed or disrupted cell.

As used herein, an agent is said to be randomly selected when the agent is chosen randomly without considering the specific sequences involved in the association of a protein alone or with its associated substrates, binding partners, etc. An example of randomly selected agents is the use a chemical library or a 15 peptide combinatorial library, or a growth broth of an organism or conditioned medium.

As used herein, an agent is said to be rationally selected or designed when the agent is chosen on a non-random basis which takes into account the sequence of the target site and/or its conformation in connection with the 20 agent's action. As described in the Examples, there are proposed binding sites for serine protease and (catalytic) sites in the protein having SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4. Agents can be rationally selected or rationally designed by utilizing the peptide sequences that make up these sites. For example, a rationally selected peptide agent can be a peptide whose amino acid sequence is 25 identical to the ATP or calmodulin binding sites or domains.

For clarity of disclosure, and not by way of limitation, the detailed description is divided into the subsections that follow.

B. CVSP14 polypeptides, muteins, derivatives and analogs thereof

SPs

30 The serine proteases (SPs) are a family of proteins found in mammals and also other species. SPs that share a number of common structural features as described herein. The proteolytic domains share sequence homology including

-42-

conserved His, Asp, and Ser residues necessary for catalytic activity that are present in conserved motifs. These SPs are synthesized as zymogens, and activated to two chain forms by specific cleavage.

The SP family can be target for therapeutic intervention and also can 5 serve as diagnostic markers for tumor initiation, development, growth and/or progression. As discussed, members of this family are involved in proteolytic processes that are implicated in tumor development, growth and/or progression. This implication is based upon their functions as proteolytic enzymes in 10 extracellular matrix degradation and remodelling and growth and pro-angiogenic factor activation. In addition, their levels of expression or level of activation or their apparent activity resulting from substrate levels or alterations in substrates and levels thereof differs in tumor cells and non-tumor cells in the same tissue. Hence, protocols and treatments that alter their activity, such as their proteolytic 15 activities and roles in signal transduction, and/or their expression, such as by contacting them with a compound that modulates their activity and/or expression, could impact tumor development, growth and/or progression. Also, in some instances, the level of activation and/or expression can be altered in tumors, such as pancreas, stomach, uterus, lung, colon and cervical cancers, 20 and also breast, prostate or leukemias. The SP, thus, can serve as a diagnostic marker for tumors.

In other instances the SP protein can exhibit altered activity by virtue of a change in activity or expression of a co-factor therefor or a substrate therefor. Detection of the SPs, particularly the protease domains, in body fluids, such as serum, blood, saliva, cerebral spinal fluid, synovial fluid and interstitial fluids, 25 urine, sweat and other such fluids and secretions, can serve as a diagnostic tumor marker. In particular, detection of higher levels of such polypeptides in a subject compared to a subject known not to have any neoplastic disease or compared to earlier samples from the same subject, can be indicative of neoplastic disease in the subject.

30 Provided is a family member designated CVSP14. It is shown herein, that the CVSP14s provided herein are serine proteases that are expressed and/or activated in certain tumors; hence their activation or expression can serve as a

-43-

diagnostic marker for tumor development, growth and/or progression. The CVSP14 is also provided for use as a drug target and used in screening assays, including those exemplified herein. It is shown herein that the single chain proteolytic domain can function *in vitro* and, hence is useful in *in vitro* assays for 5 identifying agents that modulate the activity of members of this family. In addition the two-chain form or the full-length or truncated forms thereof, such as forms in which the signal peptide is removed can also be used in such assays.

In certain embodiments, the CVSP14 polypeptide is detectable in a body fluid at a level that differs from its level in body fluids in a subject not having a 10 tumor. In other embodiments, the polypeptide is present in a tumor; and a substrate or cofactor for the polypeptide is expressed at levels that differ from its level of expression in a non-tumor cell in the same type of tissue.

CVSP14

Provided are substantially purified CVSP14 zymogens, activated two 15 chain forms, single chain protease domains and two chain protease domains. A full-length CVSP14 polypeptide, including the signal sequence, is set forth in SEQ ID Nos. 12 and 13. The signal sequence can be cleaved upon expression or prior to expression.

Also provided is a substantially purified protein including a sequence of 20 amino acids that has at least 60%, 70%, 80%, 90% or about 95% identity to the CVSP14 where the percentage identity is determined using standard algorithms and gap penalties that maximize the percentage identity. A human CVSP14 polypeptide is exemplified, although other mammalia CVSP14 polypeptides are contemplated. Splice variants of the CVSP14, particularly 25 those with a proteolytically active protease domain, are contemplated herein.

In other embodiments, substantially purified polypeptides that include a protease domain of a CVSP14 polypeptide or a catalytically active portion thereof, but that do not include the entire sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 13 are provided. Among these are polypeptides that include a 30 sequence of amino acids that has at least 60%, 70%, 80%, 90%, 95% or 100% sequence identity to SEQ ID No. 6.

Provided are substantially purified CVSP14 polypeptides and functional domains thereof, including catalytically active domains and portions, that have at least about 60%, 70%, 80%, 90% or about 95% sequence identity with a protease domain that includes the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 or a catalytically active portion thereof or with a protease that includes the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 13 and domains thereof.

With reference to SEQ ID No. 6, the protease activation cleavage site is between R₃₅ and I₅₉; the catalytic triad based upon homology is H₉₈, D₁₄₈, S₂₄₄; there is a potential N-glycosylation site at N₁₀₉VT; Cys pairing is predicted to be 10 between C₃₇-C₁₆₈, which links the protease domain to the remainder of the polypeptide), C₁₈₀-C₂₅₀, C₂₁₁-C₂₂₉ and C₂₄₀-C₂₈₉. Hence C₁₆₈ is a free Cys in the protease domain, which also can be provided as a two chain molecule. It is shown herein, however, that the single chain form is proteolytically active.

Also provided are polypeptides that are encoded by the nucleic acid 15 molecules provided herein. Included among those polypeptides are the CVSP14 protease domain or a polypeptide with amino acid changes such that the specificity and protease activity is not eliminated and is retained at least 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or remains substantially unchanged. In particular, a substantially purified mammalian SP protein is 20 provided that includes a serine protease catalytic domain and can additionally include other domains. The CVSP14 can form homodimers and can also form heterodimers with some other protein, such as a membrane-bound protein.

The domains, fragments, derivatives or analogs of a CVSP14 that are functionally active are capable of exhibiting one or more functional activities 25 associated with the CVSP14 polypeptide, such as serine protease activity, immunogenicity and antigenicity, are provided.

Antigenic epitopes that contain at least 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, and typically 10-15 amino acids of the CVSP14 polypeptide are provided. These antigenic epitopes are used, for example, to 30 raise antibodies. Antibodies specific for each epitope or combinations thereof and for single and two-chain forms are also provided.

Mutants and derivatives of CVSP14 polypeptides

-45-

Full-length CVSP14, zymogen and activated forms thereof and CVSP14 protease domains, portions thereof, and muteins and derivatives of such polypeptides are provided. Among the derivatives are those based on animal CVSP14s, including, but are not limited to, rodent, such as mouse and rat; fowl, 5 such as chicken; ruminants, such as goats, cows, deer, sheep; ovine, such as pigs; and humans. For example, CVSP14 derivatives can be made by altering their sequences by substitutions, additions or deletions. CVSP14 derivatives include, but are not limited to, those containing, as a primary amino acid sequence, all or part of the amino acid sequence of CVSP14, including altered 10 sequences in which functionally equivalent amino acid residues are substituted for residues within the sequence resulting in a silent change. For example, one or more amino acid residues within the sequence can be substituted by another amino acid of a similar polarity which acts as a functional equivalent, resulting in a silent alteration. Substitutes for an amino acid within the sequence can be 15 selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan and methionine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include 20 arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid (see, e.g., Table 1). Muteins of the CVSP14 or a domain thereof, such as a protease domain, in which up to about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% or 95% of the amino acids are replaced with another amino acid are provided. Generally such 25 muteins retain at least about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% or 90% of the protease activity of the unmutated protein.

Muteins in which one or more of the Cys residues, particularly, a residue that is paired in the activated two form, but unpaired in the protease domain alone (i.e., the Cys at residue position 26 (see SEQ ID Nos. 5 and 6) in the 30 protease domain), is/are replaced with any amino acid, typically, although not necessarily, a conservative amino acid residue, such as Ser, are contemplated. Muteins of CVSP14, particularly those in which Cys residues, such as the Cys in

-46-

the single chain protease domain, is replaced with another amino acid that does not eliminate the activity, are provided.

Muteins of the protein are also provided in which amino acids are replaced with other amino acids. Among the muteins are those in which the Cys residues, is/are replaced typically although not necessarily, with a conservative amino acid residues, such as a serine. Such muteins are also provided herein. Muteins in which 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% or more of the amino acids are replaced but the resulting polypeptide retains at least about 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 95% of the catalytic activity as the unmodified form for the same substrate.

Protease domains

Isolated, substantially pure proteases that include the protease domains or catalytically active portions thereof as single chain forms of SPs are provided. The protease domains can be included in a longer protein, and such longer protein is optionally the CVSP14 zymogen. Provided herein are isolated substantially pure single polypeptides that contain the protease domain of a CVSP14 as a single chain. The CVSP14 provided herein is expressed or activated by or in tumor cells, typically at a level that differs from the level in which they are expressed by the non-tumor cell of the same type. Hence, for example, if the SP is expressed by a prostate or ovarian tumor cell, to be of interest herein with respect to ovarian or prostate cancer, it an expression, extent of activation or activity that is different from that in non-tumor cells. CVSP14 is expressed in lung, colon, prostate, breast, uterine, ovarian and other tumor cells.

SP protease domains include the single chain protease domains of CVSP14. Provided are the protease domains or proteins that include a portion of an SP that is the protease domain of any SP, particularly a CVSP14. The protein can also include other non-SP sequences of amino acids, but includes the protease domain or a sufficient portion thereof to exhibit catalytic activity in any *in vitro* assay that assess such protease activity, such as any provided herein. Also provided are two chain activated forms of the full length protease and also two chain forms of the protease domain.

In an embodiment, the substantially purified SP protease is encoded by a nucleic acid that hybridizes to the a nucleic acid molecule containing the protease domain encoded by the nucleotide sequence set forth in SEQ. ID No. 5 under at least moderate, generally high, stringency conditions, such that the 5 protease domain encoding nucleic acid thereof hybridizes along its full length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full length. In other embodiments the substantially purified SP protease is a single chain polypeptide that includes substantially the sequence of amino acids set forth in SEQ. ID No. 6, or a catalytically active portion thereof.

10 In particular, exemplary protease domains include at least a sufficient portion of sequences of amino acids set forth in SEQ. ID No. 6 (encoded by nucleotides in SEQ. ID No. 5) to exhibit protease activity in an assay provided herein.

The signal peptide (amino acids 1-26 of SEQ. ID No. 13) is also provided.

15 In addition the mature CVSP15 polypeptide with the signal sequence removed is provided.

As described below, all forms of the CVSP14, including the pro-polypeptide with the signal sequence, the mature polypeptide and catalytically active portions thereof, the protease domains and catalytically active portions 20 thereof, two-chain and single chain forms of any of these proteins are provided herein and can be used in the screening assays and for preparing antibodies specific therefore. The expression, quantity and/or activation of the protein in tumor cells and body fluids can be diagnostic of disease or its absence.

25 **Nucleic acid molecules, vectors and plasmids, cells and expression of CVSP14 polypeptides**

Nucleic acid molecules

Due to the degeneracy of nucleotide coding sequences, other nucleic sequences which encode substantially the same amino acid sequence as a CVSP14 gene can be used. These include but are not limited to nucleotide 30 sequences comprising all or portions of CVSP14 genes that are altered by the substitution of different codons that encode the amino acid residue within the sequence, thus producing a silent change.

-48-

Also provided are nucleic acid molecules that hybridize to the above-noted sequences of nucleotides encoding CVSP14 at least at low stringency, at moderate stringency, and/or at high stringency, and that encode the protease domain and/or the full length protein or other domains of a CVSP14 or a splice 5 variant or allelic variant thereof. Generally the molecules hybridize under such conditions along their full length (or along at least about 70%, 80% or 90% of the full length) for at least one domain and encode at least one domain, such as the protease domain, of the polypeptide. In particular, such nucleic acid molecules include any isolated nucleic fragment that encodes at least one 10 domain of a serine protease, that (1) contains a sequence of nucleotides that encodes the protease or a functionally active, such as catalytically active, domain thereof, and (2) is selected from among:

15 (a) a sequence of nucleotides that encodes the protease or a domain thereof includes a sequence of nucleotides set forth in SEQ ID Nos. 5 or 12;

(b) a sequence of nucleotides that encodes such portion or the full length protease and hybridizes under conditions of moderate or high stringency, generally to nucleic acid that is complementary to a mRNA transcript present in a mammalian cell that encodes such 20 protein or fragment thereof;

(c) a sequence of nucleotides that encodes a serine protease or domain thereof that includes a sequence of amino acids encoded by such portion or the full length open reading frame;

(d) a sequence of nucleotides that encodes the serine protease that includes a sequence of amino acids encoded by a sequence of nucleotides that encodes such subunit and hybridizes under 25 conditions of high stringency to DNA that is complementary to the mRNA transcript;

-49-

- (e) a sequence of nucleotides that encodes a splice variant of any of (a)-(d); and
 - (f) a sequence of nucleotides that includes degenerate codons of all or a portion of any of (a)-(e).
- 5 The isolated nucleic acid fragment is DNA, including genomic or cDNA, or is RNA, or can include other components, such as protein nucleic acid. The isolated nucleic acid can include additional components, such as heterologous or native promoters, and other transcriptional and translational regulatory sequences, these genes can be linked to other genes, such as reporter genes or
- 10 other indicator genes or genes that encode indicators.

The CVS14s provided herein are encoded by a nucleic acid that includes sequence encoding a protease domain that exhibits proteolytic activity and that hybridizes to a nucleic acid molecule including the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5, typically under moderate, generally under high stringency, 15 conditions and generally along the full length of the protease domain or along at least about 70%, 80% or 90% of the full length. Splice variants are also provided herein.

In a specific embodiment, a nucleic acid that encodes a CVSP, designated CVSP14 is provided. In particular, the nucleic acid includes the sequence of 20 nucleotides set forth in SEQ ID No. 5 or a portion thereof that encodes a catalytically active polypeptide. Also provided are nucleic acid molecules that hybridize under conditions of at least low stringency, generally moderate stringency, more typically high stringency to the SEQ ID No. 5 or degenerates thereof.

25 In one embodiment, the isolated nucleic acid fragment hybridizes to a nucleic acid molecule containing the nucleotide sequence set forth in SEQ ID No: 5 (or degenerates thereof) under high stringency conditions, in one embodiment contains the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID Nos. 5 and 6). A full-length CVSP14 is set forth in SEQ ID No. 13 and is encoded by SEQ ID No. 12

30 or degenerates thereof.

-50-

Also contemplated are nucleic acid molecules that encode a single chain SP protease that have proteolytic activity in an *in vitro* proteolysis assay and that have at least 60%, 70%, 80%, 85%, 90% or 95% sequence identity with the full length of a protease domain of a CVSP14 polypeptide, or that hybridize 5 along their full length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full length to a nucleic acids that encode a protease domain, particularly under conditions of moderate, generally high, stringency. As above, the encoded polypeptides contain the protease as a single chain.

The isolated nucleic acids can contain least 10 nucleotides, 25 10 nucleotides, 50 nucleotides, 100 nucleotides, 150 nucleotides, or 200 nucleotides or more contiguous nucleotides of a CVSP14-encoding sequence, or a full-length SP coding sequence. In another embodiment, the nucleic acids are smaller than 35, 200 or 500 nucleotides in length. Nucleic acids that hybridize to or are complementary to a CVSP14-encoding nucleic acid molecule can be 15 single or double-stranded. For example, nucleic acids are provided that include a sequence complementary to (specifically are the inverse complement of) at least 10, 25, 50, 100, or 200 nucleotides or the entire coding region of a CVSP14 encoding nucleic acid, particularly the protease domain thereof. For CVSP14 the full-length protein or a domain or active fragment thereof is also provided.

20 For each of the nucleic acid molecules, the nucleic acid can be DNA or RNA or PNA or other nucleic acid analogs or can include non-natural nucleotide bases. Also provided are isolated nucleic acid molecules that include a sequence of nucleotides complementary to the nucleotide sequence encoding an SP.

Probes, primers, antisense oligonucleotides and dsRNA

25 Also provided are fragments thereof or oligonucleotides that can be used as probes or primers and that contain at least about 10, 14, 16 nucleotides, generally less than 1000 or less than or equal to 100, set forth in SEQ ID No. 5 (or the complement thereof); or contain at least about 30 nucleotides (or the complement thereof) or contain oligonucleotides that hybridize along their full 30 length or along at least about 70%, 80% or 90% of the full length to any such fragments or oligonucleotides. The length of the fragments are a function of the purpose for which they are used and/or the complexity of the genome of

-51-

interest. Generally probes and primers contain less than about 500, 150, 100 nucleotides.

Probes and primers derived from the nucleic acid molecules are provided. Such probes and primers contain at least 8, 14, 16, 30, 100 or more contiguous 5 nucleotides with identity to contiguous nucleotides of a CVSP14. The probes and primers are optionally labelled with a detectable label, such as a radiolabel or a fluorescent tag, or can be mass differentiated for detection by mass spectrometry or other means.

Also provided is an isolated nucleic acid molecule that includes the 10 sequence of molecules that is complementary to the nucleotide sequence encoding CVSP14 or the portion thereof. Double-stranded RNA (dsRNA), such as RNAi is also provided.

Plasmids, vectors and cells

Plasmids and vectors containing the nucleic acid molecules are also 15 provided. Cells containing the vectors, including cells that express the encoded proteins are provided. The cell can be a bacterial cell, a yeast cell, a fungal cell, a plant cell, an insect cell or an animal cell. Methods for producing an SP or single chain form of the protease domain thereof by, for example, growing the cell under conditions whereby the encoded SP is expressed by the cell, and 20 recovering the expressed protein, are provided herein. As noted, for CVSP14, the full-length zymogens and activated proteins and activated (two chain) protease and single chain protease domains are provided.

As discussed below, the CVSP14 polypeptide, and catalytically active portions thereof, can be expressed as a secreted protein using the native signal 25 sequence or a heterologous signal. Alternatively, as exemplified, the protein can be expressed as inclusion bodies in the cytoplasm and isolated therefrom. The resulting protein can be treated to refold (see, e.g., EXAMPLE 1). It is shown herein that active protease domain can be produced by expression in inclusion bodies, isolation therefrom and denaturation followed by refolding.

-52-

C. Tumor specificity and tissue expression profiles

Each SP has a characteristic tissue expression profile; the SPs in particular, although not exclusively expressed or activated in tumors, exhibit characteristic tumor tissue expression or activation profiles. In some instances, 5 SPs can have different activity in a tumor cell from a non-tumor cell by virtue of a change in a substrate or cofactor therefor or other factor that would alter the apparent functional activity of the SP. Hence each can serve as a diagnostic marker for particular tumors, by virtue of a level of activity and/or expression or function in a subject (i.e. a mammal, particularly a human) with neoplastic 10 disease, compared to a subject or subjects that do not have the neoplastic disease. In addition, detection of activity (and/or expression) in a particular tissue can be indicative of neoplastic disease.

Circulating SPs in body fluids can be indicative of neoplastic disease. Secreted CVSP14 or activated CVSP14 is indicative of neoplastic disease. Also, 15 by virtue of the activity and/or expression profiles of each, they can serve as therapeutic targets, such as by administration of modulators of the activity thereof, or, as by administration of a prodrug specifically activated by one of the SPs.

Tissue expression profiles

CVSP14

The CVSP14 is expressed at high levels in an androgen-independent tumor cell line. The CVSP14 transcript was detected in normal kidney samples. CVSP14 signals were diminished in all the matched kidney tumor samples. Weak signals were detected in all three pairs of prostate normal/tumor cDNA 25 samples. Weak signals were also detected in 3 of 9 normal breast samples. A weak signal was also detected in one of the 7 uterine tumors, but not in their normal tissue counterparts. Weak signals were also detected in two of the three normal lung tissue samples, but not in their matched tumor samples. Very weak signals can be seen in cDNA samples from various tumor cell lines, including 30 HeLa cells, Burkitt's lymphoma Daudi cells, chronic myelogenous leukemia K562, promyelocytic leukemia HL-60 cells, melanoma G361 cells, lung carcinoma A549

-53-

cells, lymphoblastic leukemia MOLT-4 and colorectal adenocarcinoma SW480 cells.

Hence expression in certain cells, such as prostate cancer, can serve as a tumor marker; whereas in other tissues, such as kidney, the absence of 5 expression or activation, can serve as a tumor marker.

D. Identification and isolation of SP protein genes

The SP polypeptides, including CVSP14 polypeptides, or domains thereof, can be obtained by methods well known in the art for protein purification and recombinant protein expression. Any method known to those of skill in the art 10 for identification of nucleic acids that encode desired genes can be used. Any method available in the art can be used to obtain a full length (*i.e.*, encompassing the entire coding region) cDNA or genomic DNA clone encoding an SP protein. In particular, the polymerase chain reaction (PCR) can be used to amplify a sequence identified as being differentially expressed or encoding 15 proteins activated at different levels in tumor and non-tumor cells or tissues, *e.g.*, nucleic acids encoding a CVSP14 polypeptide (SEQ. NOs: 5, 6, 12 and 13), in a genomic or cDNA library. Oligonucleotide primers that hybridize to sequences at the 3' and 5' termini of the identified sequences can be used as primers to amplify by PCR sequences from a nucleic acid sample (RNA or DNA), 20 typically a cDNA library, from an appropriate source (*e.g.*, tumor or cancer tissue).

PCR can be carried out, *e.g.*, by use of a Perkin-Elmer Cetus thermal cycler and Taq polymerase (Gene Amp[®]). The DNA being amplified can include mRNA or cDNA or genomic DNA from any eukaryotic species. One can choose 25 to synthesize several different degenerate primers, for use in the PCR reactions. It is also possible to vary the stringency of hybridization conditions used in priming the PCR reactions, to amplify nucleic acid homologs (*e.g.*, to obtain *SP protein* sequences from species other than humans or to obtain human sequences with homology to CVSP14 polypeptide) by allowing for greater or 30 lesser degrees of nucleotide sequence similarity between the known nucleotide sequence and the nucleic acid homolog being isolated. For cross species hybridization, low or moderate stringency conditions are used. For same species

-54-

hybridization, moderately or high stringency conditions generally are used. After successful amplification of the nucleic acid containing all or a portion of the identified SP protein sequence or of a nucleic acid encoding all or a portion of an SP protein homolog, that segment can be molecularly cloned and sequenced, 5 and used as a probe to isolate a complete cDNA or genomic clone. This, in turn, permits the determination of the gene's complete nucleotide sequence, the analysis of its expression, and the production of its protein product for functional analysis. Once the nucleotide sequence is determined, an open reading frame encoding the SP protein gene protein product can be determined by any method 10 well known in the art for determining open reading frames, for example, using publicly available computer programs for nucleotide sequence analysis. Once an open reading frame is defined, it is routine to determine the amino acid sequence of the protein encoded by the open reading frame. In this way, the nucleotide sequences of the entire SP protein genes as well as the amino acid sequences of 15 SP protein proteins and analogs can be identified.

Any eukaryotic cell potentially can serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of the SP protein gene. The nucleic acids can be isolated from vertebrate, mammalian, human, porcine, bovine, feline, avian, equine, canine, as well as additional primate sources, insects, plants, etc. The DNA can 20 be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (e.g., a DNA "library"), by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell (see, for example, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, 25 D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II). Clones derived from genomic DNA can contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones derived from cDNA contains only exon sequences. Whatever the source, the gene should be molecularly cloned into a suitable vector for propagation of the gene.

30 In the molecular cloning of the gene from genomic DNA, DNA fragments are generated, some of which encode the desired gene. The DNA can be cleaved at specific sites using various restriction enzymes. Alternatively, one

-55-

can use DNase in the presence of manganese to fragment the DNA, or the DNA can be physically sheared, for example, by sonication. The linear DNA fragments can then be separated according to size by standard techniques, including but not limited to, agarose and polyacrylamide gel electrophoresis and 5 column chromatography.

Once the DNA fragments are generated, identification of the specific DNA fragment containing the desired gene can be accomplished in a number of ways. For example, a portion of the SP protein (of any species) gene (e.g., a PCR 10 amplification product obtained as described above or an oligonucleotide having a sequence of a portion of the known nucleotide sequence) or its specific RNA, or a fragment thereof be purified and labeled, and the generated DNA fragments can be screened by nucleic acid hybridization to the labeled probe (Benton and Davis, *Science* 196:180 (1977); Grunstein and Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3961 (1975)). Those DNA fragments with substantial homology to 15 the probe hybridize. It is also possible to identify the appropriate fragment by restriction enzyme digestion(s) and comparison of fragment sizes with those expected according to a known restriction map if such is available or by DNA sequence analysis and comparison to the known nucleotide sequence of SP protein. Further selection can be carried out on the basis of the properties of the 20 gene. Alternatively, the presence of the gene can be detected by assays based on the physical, chemical, or immunological properties of its expressed product. For example, cDNA clones, or DNA clones which hybrid-select the proper mRNA, can be selected which produce a protein that, e.g., has similar or identical electrophoretic migration, isoelectric focusing behavior, proteolytic 25 digestion maps, antigenic properties, serine protease activity. If an anti-SP protein antibody is available, the protein can be identified by binding of labeled antibody to the putatively SP protein synthesizing clones, in an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)-type procedure.

Alternatives to isolating the CVSP14 polypeptide genomic DNA include, 30 but are not limited to, chemically synthesizing the gene sequence from a known sequence or making cDNA to the mRNA that encodes the SP protein. For example, RNA for cDNA cloning of the SP protein gene can be isolated from

- cells expressing the protein. The identified and isolated nucleic acids can then be inserted into an appropriate cloning vector. A large number of vector-host systems known in the art can be used. Possible vectors include, but are not limited to, plasmids or modified viruses, but the vector system must be
- 5 compatible with the host cell used. Such vectors include, but are not limited to, bacteriophages such as lambda derivatives, or plasmids such as pBR322 or pUC plasmid derivatives or the Bluescript vector (Stratagene, La Jolla, CA). The insertion into a cloning vector can, for example, be accomplished by ligating the DNA fragment into a cloning vector which has complementary cohesive termini.
- 10 If the complementary restriction sites used to fragment the DNA are not present in the cloning vector, the ends of the DNA molecules can be enzymatically modified. Alternatively, any site desired can be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers can comprise specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction
- 15 endonuclease recognition sequences. In an alternative method, the cleaved vector and SP protein gene can be modified by homopolymeric tailing. Recombinant molecules can be introduced into host cells via, for example, transformation, transfection, infection, electroporation and sonoporation, so that many copies of the gene sequence are generated.
- 20 In specific embodiments, transformation of host cells with recombinant DNA molecules that incorporate the isolated SP protein gene, cDNA, or synthesized DNA sequence enables generation of multiple copies of the gene. Thus, the gene can be obtained in large quantities by growing transformants, isolating the recombinant DNA molecules from the transformants and, when necessary, retrieving the inserted gene from the isolated recombinant DNA.
- E. **Vectors, plasmids and cells that contain nucleic acids encoding an SP protein or protease domain thereof and expression of SP proteins**
- Vectors and cells**
- For recombinant expression of one or more of the SP proteins, the nucleic acid containing all or a portion of the nucleotide sequence encoding the SP protein can be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector that contains the necessary elements for the transcription and translation of the

inserted protein coding sequence. The necessary transcriptional and translational signals also can be supplied by the native promoter for SP genes, and/or their flanking regions.

Also provided are vectors that contain nucleic acid encoding the SPs.

5 Cells containing the vectors are also provided. The cells include eukaryotic and prokaryotic cells, and the vectors are any suitable for use therein.

Prokaryotic and eukaryotic cells, including endothelial cells, containing the vectors are provided. Such cells include bacterial cells, yeast cells, fungal cells, plant cells, insect cells and animal cells. The cells are used to produce an SP 10 protein or protease domain thereof by growing the above-described cells under conditions whereby the encoded SP protein or protease domain of the SP protein is expressed by the cell, and recovering the expressed protease domain protein. For purposes herein, the protease domain can be secreted into the medium.

In one embodiment, the vectors include a sequence of nucleotides that 15 encodes a polypeptide that has protease activity and contains all or a portion of only the protease domain, or multiple copies thereof, of an SP protein are provided. Also provided are vectors that comprise a sequence of nucleotides that encodes the protease domain and additional portions of an SP protein up to and including a full length SP protein, as well as multiple copies thereof, are also 20 provided. The vectors can be selected for expression of the SP protein or protease domain thereof in the cell or such that the SP protein is expressed as a secreted protein. Alternatively, the vectors can include signals necessary for secretion of encoded proteins. When the protease domain is expressed the nucleic acid is linked to nucleic acid encoding a secretion signal, such as the *Saccharomyces* 25 *cerevisiae* a mating factor signal sequence or a portion thereof, or the native signal sequence.

A variety of host-vector systems can be used to express the protein coding sequence. These include but are not limited to mammalian cell systems infected with virus (e.g. vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems 30 infected with virus (e.g. baculovirus); microorganisms such as yeast containing yeast vectors; or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and

specificities. Depending on the host-vector system used, any one of a number of suitable transcription and translation elements can be used.

Any methods known to those of skill in the art for the insertion of DNA fragments into a vector can be used to construct expression vectors containing a chimeric gene containing of appropriate transcriptional/translational control signals and protein coding sequences. These methods can include *in vitro* recombinant DNA and synthetic techniques and *in vivo* recombinants (genetic recombination). Expression of nucleic acid sequences encoding SP protein, or domains, derivatives, fragments or homologs thereof, can be regulated by a second nucleic acid sequence so that the genes or fragments thereof are expressed in a host transformed with the recombinant DNA molecule(s). For example, expression of the proteins can be controlled by any promoter/enhancer known in the art. In a specific embodiment, the promoter is not native to the genes for SP protein. Promoters which can be used include but are not limited to the SV40 early promoter (Bernoist and Chambon, *Nature* 290:304-310 (1981)), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto *et al.*, *Cell* 22:787-797 (1980)), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1441-1445 (1981)), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, *Nature* 296:39-42 (1982)); prokaryotic expression vectors such as the β -lactamase promoter (Villa-Kamaroff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-3731 (1978)) or the *tac* promoter (DeBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 (1983)); see also "Useful Proteins from Recombinant Bacteria" in Scientific American 242:79-94 (1980)); plant expression vectors containing the nopaline synthetase promoter (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature* 303:209-213 (1984)) or the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter (Garder *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 9:2871 (1981)), and the promoter of the photosynthetic enzyme ribulose bisphosphate carboxylase (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature* 310:115-120 (1984)); promoter elements from yeast and other fungi such as the Gal4 promoter, the alcohol dehydrogenase promoter, the phosphoglycerol kinase promoter, the alkaline phosphatase promoter, and the following animal transcriptional control regions that exhibit tissue specificity and have been used in transgenic animals: elastase

-59-

I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, *Cell* 38:639-646 (1984); Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology* 7:425-515 (1987)); insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan *et al.*, *Nature* 315:115-122 (1985)), immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl *et al.*, *Cell* 38:647-658 (1984); Adams *et al.*, *Nature* 318:533-538 (1985); Alexander *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444 (1987)), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, *Cell* 45:485-495 (1986)), albumin gene control region which is active in liver (Pinckert *et al.*, *Genes and Devel.* 1:268-276 (1987)), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 (1985); Hammer *et al.*, *Science* 235:53-58 (1987)), alpha-1 antitrypsin gene control region which is active in liver (Kelsey *et al.*, *Genes and Devel.* 1:161-171 (1987)), beta globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, *Nature* 315:338-340 (1985); Kollas *et al.*, *Cell* 46:89-94 (1986)), myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells of the brain (Readhead *et al.*, *Cell* 48:703-712 (1987)), myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, *Nature* 314:283-286 (1985)), and gonadotrophic releasing hormone gene control region which is active in gonadotrophs of the hypothalamus (Mason *et al.*, *Science* 234:1372-1378 (1986)).

In a specific embodiment, a vector is used that contains a promoter operably linked to nucleic acids encoding an SP protein, or a domain, fragment, derivative or homolog, thereof, one or more origins of replication, and optionally, 25 one or more selectable markers (e.g., an antibiotic resistance gene). Expression vectors containing the coding sequences, or portions thereof, of an SP protein, is made, for example, by subcloning the coding portions into the EcoRI restriction site of each of the three pGEX vectors (glutathione S-transferase expression vectors (Smith and Johnson, *Gene* 7:31-40 (1988)). This allows for the 30 expression of products in the correct reading frame. Vectors and systems for expression of the protease domains of the SP proteins include the well known *Pichia* vectors (available, for example, from Invitrogen, San Diego, CA),

-60-

particularly those designed for secretion of the encoded proteins. One exemplary vector is described in the EXAMPLES.

Plasmids for transformation of *E. coli* cells, include, for example, the pET expression vectors (see, U.S patent 4,952,496; available from NOVAGEN, Madison, WI; see, also literature published by Novagen describing the system). Such plasmids include pET 11a, which contains the T7lac promoter, T7 terminator, the inducible *E. coli* lac operator, and the lac repressor gene; pET 12a-c, which contains the T7 promoter, T7 terminator, and the *E. coli* ompT secretion signal; and pET 15b and pET19b (NOVAGEN, Madison, WI), which contain a His-Tag™ leader sequence for use in purification with a His column and a thrombin cleavage site that permits cleavage following purification over the column; the T7-lac promoter region and the T7 terminator.

The vectors are introduced into host cells, such as *Pichia* cells and bacterial cells, such as *E. coli*, and the proteins expressed therein. *Pichia* strains, which are known and readily available, include, for example, GS115. Bacterial hosts can contain chromosomal copies of DNA encoding T7 RNA polymerase operably linked to an inducible promoter, such as the lacUV promoter (see, U.S. Patent No. 4,952,496). Such hosts include, but are not limited to, the lysogenic *E. coli* strain BL21(DE3).

20 Expression and production of proteins

The SP domains, derivatives and analogs can be produced by various methods known in the art. For example, once a recombinant cell expressing an SP protein, or a domain, fragment or derivative thereof, is identified, the individual gene product can be isolated and analyzed. This is achieved by assays based on the physical and/or functional properties of the protein, including, but not limited to, radioactive labeling of the product followed by analysis by gel electrophoresis, immunoassay, cross-linking to marker-labeled product.

25 The CVSP14 polypeptides can be isolated and purified by standard methods known in the art (either from natural sources or recombinant host cells expressing the complexes or proteins), including but not restricted to column chromatography (e.g., ion exchange, affinity, gel exclusion, reversed-phase high

-61-

pressure, fast protein liquid, etc.), differential centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique used for the purification of proteins. Functional properties can be evaluated using any suitable assay known in the art.

- 5 Alternatively, once an SP protein or its domain or derivative is identified, the amino acid sequence of the protein can be deduced from the nucleotide sequence of the gene which encodes it. As a result, the protein or its domain or derivative can be synthesized by standard chemical methods known in the art (e.g. see Hunkapiller et al, *Nature* 310:105-111 (1984)).
- 10 Manipulations of SP protein sequences can be made at the protein level. Also contemplated herein are SP protein proteins, domains thereof, derivatives or analogs or fragments thereof, which are differentially modified during or after translation, e.g., by glycosylation, acetylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage
- 15 to an antibody molecule or other cellular ligand, etc. Any of numerous chemical modifications can be carried out by known techniques, including but not limited to specific chemical cleavage by cyanogen bromide, trypsin, chymotrypsin, papain, V8 protease, NaBH₄, acetylation, formylation, oxidation, reduction, metabolic synthesis in the presence of tunicamycin, etc.
- 20 In addition, domains, analogs and derivatives of an SP protein can be chemically synthesized. For example, a peptide corresponding to a portion of an SP protein, which includes the desired domain or which mediates the desired activity *in vitro* can be synthesized by use of a peptide synthesizer. Furthermore, if desired, nonclassical amino acids or chemical amino acid analogs
- 25 can be introduced as a substitution or addition into the SP protein sequence. Non-classical amino acids include but are not limited to the D-isomers of the common amino acids, α -amino isobutyric acid, 4-aminobutyric acid, Abu, 2-aminobutyric acid, ϵ -Abu, ϵ -Ahx, 6-amino hexanoic acid, Aib, 2-amino isobutyric acid, 3-amino propionic acid, ornithine, norleucine, norvaline,
- 30 hydroxyproline, sarcosine, citrulline, cysteic acid, t-butylglycine, t-butylalanine, phenylglycine, cyclohexylalanine, β -alanine, fluoro-amino acids, designer amino acids such as β -methyl amino acids, α -methyl amino acids, Na-methyl amino

-62-

acids, and amino acid analogs in general. Furthermore, the amino acid can be D (dextrorotary) or L (levorotary).

In cases where natural products are suspected of having a mutation or are isolated from new species, the amino acid sequence of the SP protein 5 isolated from the natural source, as well as those expressed *in vitro*, or from synthesized expression vectors *in vivo* or *in vitro*, can be determined from analysis of the DNA sequence, or alternatively, by direct sequencing of the isolated protein. Such analysis can be performed by manual sequencing or through use of an automated amino acid sequenator.

10 In particular, for expression of the protease domain of the CVSP14, it was found to be advantageous to express the protein intracellularly without a signal sequence, which results in accumulation or formation of inclusion bodies containing protease domain. The inclusion bodies are isolated, denatured, solubilized and refolded protease domain, which is then activated by cleavage at 15 the RI site (see, e.g., EXAMPLES).

Modifications

A variety of modification of the SP proteins and domains are contemplated herein. An SP-encoding nucleic acid molecule can be modified by any of numerous strategies known in the art (Sambrook *et al.* (1989) *Molecular 20 Cloning, A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). The sequences can be cleaved at appropriate sites with restriction endonuclease(s), followed by further enzymatic modification if desired, isolated, and ligated *in vitro*. In the production of the gene encoding a domain, derivative or analog of SP, care should be taken to ensure that the 25 modified gene retains the original translational reading frame, uninterrupted by translational stop signals, in the gene region where the desired activity is encoded.

Additionally, the SP-encoding nucleic acid molecules can be mutated *in vitro* or *in vivo*, to create and/or destroy translation, initiation, and/or termination 30 sequences, or to create variations in coding regions and/or form new restriction endonuclease sites or destroy pre-existing ones, to facilitate further *in vitro* modification. Also, as described herein mutants with primary sequence

- alterations, such as replacements of Cys residues and elimination of glycosylation sites are contemplated. Such mutations can be effected by any technique for mutagenesis known in the art, including, but not limited to, chemical mutagenesis and *in vitro* site-directed mutagenesis (Hutchinson et al., 5 *J. Biol. Chem.* 253:6551-6558 (1978)), use of TAB[®] linkers (Pharmacia). In one embodiment, for example, an SP protein or domain thereof is modified to include a fluorescent label. In other specific embodiments, the SP protein is modified to have a heterofunctional reagent, such heterofunctional reagents can be used to crosslink the members of the complex.
- 10 The SP proteins can be isolated and purified by standard methods known in the art (either from natural sources or recombinant host cells expressing the complexes or proteins), including but not restricted to column chromatography (e.g., ion exchange, affinity, gel exclusion, reversed-phase high pressure, fast protein liquid, etc.), differential centrifugation, differential solubility, or by any 15 other standard technique used for the purification of proteins. Functional properties can be evaluated using any suitable assay known in the art.
- F. Screening methods**
- The single chain protease domains, as shown herein, can be used in a variety of methods to identify compounds that modulate the activity thereof. For 20 SPs that exhibit higher activity or expression in tumor cells, compounds that inhibit the proteolytic activity are of particular interest. For any SPs that are active at lower levels in tumor cells, compounds or agents that enhance the activity are potentially of interest. In all instances the identified compounds include agents that are candidate cancer treatments.
- 25 Several types of assays are exemplified and described herein. It is understood that the protease domains can be used in other assays. It is shown here, however, that the single chain protease domains exhibit catalytic activity. As such they are ideal for *in vitro* screening assays. They can also be used in binding assays.
- 30 The CVSP14 full length zymogens, activated enzymes, single and two chain protease domains are contemplated for use in any screening assay known to those of skill in the art, including those provided herein. Hence the following

-64-

description, if directed to proteolytic assays is intended to apply to use of a single chain protease domain or a catalytically active portion thereof of any SP, including a CVSP14. Other assays, such as binding assays are provided herein, particularly for use with a CVSP14, including any variants, such as splice
5 variants thereof.

1. **Catalytic Assays for identification of agents that modulate the protease activity of an SP protein**

Methods for identifying a modulator of the catalytic activity of an SP, particularly a single chain protease domain or catalytically active portion thereof, 10 are provided herein. The methods can be practiced by: a) contacting the CVSP14, a full-length zymogen or activated form, and particularly a single-chain domain thereof, with a substrate of the CVSP14 in the presence of a test substance, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the CVSP14 is assessed, and comparing the activity to a control. For 15 example, the control can be the activity of the CVSP14 assessed by contacting a CVSP14, including a full-length zymogen or activated form, and particularly a single-chain domain thereof, particularly a single-chain domain thereof, with a substrate of the CVSP14, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the CVSP14 is assessed. The results in the presence 20 and absence of the test compounds are compared. A difference in the activity indicates that the test substance modulates the activity of the CVSP14.

Activators of activation are also contemplated; such assays are discussed below.

In one embodiment a plurality of the test substances are screened simultaneously in the above screening method. In another embodiment, the 25 CVSP14 is isolated from a target cell as a means for then identifying agents that are potentially specific for the target cell.

In another embodiment, a test substance is a therapeutic compound, and whereby a difference of the CVSP14 activity measured in the presence and in the absence of the test substance indicates that the target cell responds to the 30 therapeutic compound.

One method includes the steps of (a) contacting the CVSP14 polypeptide or protease domain thereof with one or a plurality of test compounds under

conditions conducive to interaction between the ligand and the compounds; and (b) identifying one or more compounds in the plurality that specifically binds to the ligand.

Another method provided herein includes the steps of a) contacting a CVSP14 polypeptide or protease domain thereof with a substrate of the CVSP14 polypeptide, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the CVSP14 polypeptide is assessed; b) contacting the CVSP14 polypeptide with a substrate of the CVSP14 polypeptide in the presence of a test substance, and detecting the proteolysis of the substrate, whereby the activity of the CVSP14 polypeptide is assessed; and c) comparing the activity of the CVSP14 polypeptide assessed in steps a) and b), whereby the activity measured in step a) differs from the activity measured in step b) indicates that the test substance modulates the activity of the CVSP14 polypeptide.

In another embodiment, a plurality of the test substances are screened simultaneously. In comparing the activity of a CVSP14 polypeptide in the presence and absence of a test substance to assess whether the test substance is a modulator of the CVSP14 polypeptide, it is unnecessary to assay the activity in parallel, although such parallel measurement is typical. It is possible to measure the activity of the CVSP14 polypeptide at one time point and compare the measured activity to a historical value of the activity of the CVSP14 polypeptide.

For instance, one can measure the activity of the CVSP14 polypeptide in the presence of a test substance and compare with historical value of the activity of the CVSP14 polypeptide measured previously in the absence of the test substance, and *vice versa*. This can be accomplished, for example, by providing the activity of the CVSP14 polypeptide on an insert or pamphlet provided with a kit for conducting the assay.

Methods for selecting substrates for a particular SP are described in the EXAMPLES, and particular proteolytic assays are exemplified.

Combinations and kits containing the combinations optionally including instructions for performing the assays are provided. The combinations include a CVSP14 polypeptide and a substrate of the CVSP14 polypeptide to be assayed;

-66-

and, optionally reagents for detecting proteolysis of the substrate. The substrates, which are can be chromogenic or fluorogenic molecules, including proteins, subject to proteolysis by a particular CVSP14 polypeptide, can be identified empirically by testing the ability of the CVSP14 polypeptide to cleave 5 the test substrate. Substrates that are cleaved most effectively (i.e., at the lowest concentrations and/or fastest rate or under desirable conditions), are identified.

Additionally provided herein is a kit containing the above-described combination. The kit optionally includes instructions for identifying a modulator 10 of the activity of a CVSP14 polypeptide. Any CVSP14 polypeptide is contemplated as target for identifying modulators of the activity thereof.

2. Binding assays

Also provided herein are methods for identification and isolation of agents, particularly compounds that bind to CVSP14s. The assays are designed 15 to identify agents that bind to the zymogen form, the single chain isolated protease domain (or a protein, other than a CVSP14 polypeptide, that contains the protease domain of a CVSP14 polypeptide), and to the activated form, including the activated form derived from the full length zymogen or from an extended protease domain. The identified compounds are candidates or leads 20 for identification of compounds for treatments of tumors and other disorders and diseases involving aberrant angiogenesis. The CVSP14 polypeptides used in the methods include any CVSP14 polypeptide as defined herein, including the CVSP14 single chain protease domain or proteolytically active portion thereof.

A variety of methods are provided herein. These methods can be 25 performed in solution or in solid phase reactions in which the CVSP14 polypeptide(s) or protease domain(s) thereof are linked, either directly or indirectly via a linker, to a solid support. Screening assays are described in the Examples, and these assays have been used to identify candidate compounds. For purposes herein, all binding assays described above are provided for 30 CVSP14.

Methods for identifying an agent, such as a compound, that specifically binds to a CVSP14 single chain protease domain, a zymogen or full-length

-67-

activated CVSP14 or two chain protease domain thereof are provided herein. The method can be practiced by (a) contacting the CVSP14 with one or a plurality of test agents under conditions conducive to binding between the CVSP14 and an agent; and (b) identifying one or more agents within the plurality

5 that specifically binds to the CVSP14.

For example, in practicing such methods the CVSP14 polypeptide is mixed with a potential binding partner or an extract or fraction of a cell under conditions that allow the association of potential binding partners with the polypeptide. After mixing, peptides, polypeptides, proteins or other molecules

10 that have become associated with a CVSP14 are separated from the mixture.

The binding partner that bound to the CVSP14 can then be removed and further analyzed. To identify and isolate a binding partner, the entire protein, for instance the entire disclosed protein of SEQ ID Nos. 6 can be used.

Alternatively, a fragment of the protein can be used.

15 A variety of methods can be used to obtain cell extracts or body fluids, such as blood, serum, urine, sweat, synovial fluid, CSF and other such fluids.

For example, cells can be disrupted using either physical or chemical disruption methods. Examples of physical disruption methods include, but are not limited to, sonication and mechanical shearing. Examples of chemical lysis methods

20 include, but are not limited to, detergent lysis and enzyme lysis. A skilled artisan can readily adapt methods for preparing cellular extracts in order to obtain extracts for use in the present methods.

Once an extract of a cell is prepared, the extract is mixed with the CVSP14 under conditions in which association of the protein with the binding

25 partner can occur. A variety of conditions can be used, including conditions that resemble conditions found in the cytoplasm of a human cell. Features such as osmolarity, pH, temperature, and the concentration of cellular extract used, can be varied to optimize the association of the protein with the binding partner.

Similarly, methods for isolation of molecules of interest from body fluids are

30 known.

After mixing under appropriate conditions, the bound complex is separated from the mixture. A variety of techniques can be used to separate the

-68-

mixture. For example, antibodies specific to a CVSP14 can be used to immunoprecipitate the binding partner complex. Alternatively, standard chemical separation techniques such as chromatography and density/sediment centrifugation can be used.

5 After removing the non-associated cellular constituents in the extract, the binding partner can be dissociated from the complex using conventional methods. For example, dissociation can be accomplished by altering the salt concentration or pH of the mixture.

To aid in separating associated binding partner pairs from the mixed 10 extract, the CVSP14 can be immobilized on a solid support. For example, the protein can be attached to a nitrocellulose matrix or acrylic beads. Attachment of the protein or a fragment thereof to a solid support aids in separating peptide/binding partner pairs from other constituents found in the extract. The identified binding partners can be either a single protein or a complex made up of 15 two or more proteins.

Alternatively, the nucleic acid molecules encoding the single chain proteases can be used in a yeast two-hybrid system. The yeast two-hybrid system has been used to identify other protein partner pairs and can readily be adapted to employ the nucleic acid molecules herein described.

20 Another *in vitro* binding assay, particularly for a CVSP14, uses a mixture of a polypeptide that contains at least the catalytic domain of one of these proteins and one or more candidate binding targets or substrates. After incubating the mixture under appropriate conditions, the ability of the CVSP14 or a polypeptide fragment thereof containing the catalytic domain to bind to or 25 interact with the candidate substrate is assessed. For cell-free binding assays, one of the components includes or is coupled to a detectable label. The label can provide for direct detection, such as radioactivity, luminescence, optical or electron density, *etc.*, or indirect detection such as an epitope tag, an enzyme, *etc.* A variety of methods can be employed to detect the label depending on the 30 nature of the label and other assay components. For example, the label can be detected bound to the solid substrate or a portion of the bound complex

-69-

containing the label can be separated from the solid substrate, and the label thereafter detected.

3. Detection of signal transduction

Secreted CVSPs, such as CVSP14, can be involved in signal transduction

5 either directly by binding to or interacting with a cell surface receptor or indirectly by activating proteins, such as pro-growth factors that can initiate signal transduction. Assays for assessing signal transduction are well known to those of skill in the art, and can be adapted for use with the CVSP14 polypeptide.

10 Assays for identifying agents that affect or alter signal transduction mediated directly or indirectly, such as via activation of a pro-growth factor, by a CVSP14, particularly the full length or a sufficient portion to anchor the extracellular domain or a functional portion thereof of a CVSP on the surface of a cell are provided. Such assays, include, for example, transcription based assays

15 in which modulation of a transduced signal is assessed by detecting an effect on an expression from a reporter gene (see, e.g., U.S. Patent No. 5,436,128).

4. Methods for Identifying Agents that Modulate the Expression a Nucleic Acid Encoding a CVSP14

Another embodiment provides methods for identifying agents that 20 modulate the expression of a nucleic acid encoding a CVSP14. Such assays use any available means of monitoring for changes in the expression level of the nucleic acids encoding a CVSP14.

In one assay format, cell lines that contain reporter gene fusions between the open reading frame of CVSP14 or a domain thereof, particularly the protease 25 domain and any assayable fusion partner can be prepared. Numerous assayable fusion partners are known and readily available including the firefly luciferase gene and the gene encoding chloramphenicol acetyltransferase (Alam *et al.*, *Anal. Biochem.* 188: 245-54 (1990)). Cell lines containing the reporter gene fusions are then exposed to the agent to be tested under appropriate conditions 30 and time. Differential expression of the reporter gene between samples exposed to the agent and control samples identifies agents which modulate the expression of a nucleic acid encoding a CVSP14.

-70-

Additional assay formats can be used to monitor the ability of the agent to modulate the expression of a nucleic acid encoding a CVSP14. For instance, mRNA expression can be monitored directly by hybridization to the nucleic acids. Cell lines are exposed to the agent to be tested under appropriate conditions and 5 time and total RNA or mRNA is isolated by standard procedures (see, e.g., Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Probes to detect differences in RNA expression levels between cells exposed to the agent and control cells can be prepared from the nucleic acids. It is typical, but not necessary, to design 10 probes which hybridize only with target nucleic acids under conditions of high stringency. Only highly complementary nucleic acid hybrids form under conditions of high stringency. Accordingly, the stringency of the assay conditions determines the amount of complementarity which should exist between two nucleic acid strands in order to form a hybrid. Stringency should 15 be chosen to maximize the difference in stability between the probe:target hybrid and potential probe:non-target hybrids.

Probes can be designed from the nucleic acids through methods known in the art. For instance, the G + C content of the probe and the probe length can affect probe binding to its target sequence. Methods to optimize probe 20 specificity are commonly available (see, e.g., Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press); and Ausubel *et al.* (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY).

Hybridization conditions are modified using known methods (see, e.g., 25 Sambrook *et al.* (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press); and Ausubel *et al.* (1995) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Co., NY), as required for each probe. Hybridization of total cellular RNA or RNA enriched for polyA RNA can be accomplished in any available format. For instance, total 30 cellular RNA or RNA enriched for polyA RNA can be affixed to a solid support, and the solid support exposed to at least one probe comprising at least one, or part of one of the nucleic acid molecules under conditions in which the probe

-71-

specifically hybridizes. Alternatively, nucleic acid fragments comprising at least one, or part of one of the sequences can be affixed to a solid support, such as a porous glass wafer. The glass wafer can then be exposed to total cellular RNA or polyA RNA from a sample under conditions in which the affixed sequences 5 specifically hybridize. Such glass wafers and hybridization methods are widely available, for example, those disclosed by Beattie (WO 95/11755). By examining for the ability of a given probe to specifically hybridize to an RNA sample from an untreated cell population and from a cell population exposed to the agent, agents which up or down regulate the expression of a nucleic acid 10 encoding the CVSP14 polypeptide, are identified.

In one format, the relative amounts of a protein between a cell population that has been exposed to the agent to be tested compared to an un-exposed control cell population can be assayed (e.g., a prostate cancer cell line, a lung cancer cell line, a colon cancer cell line or a breast cancer cell line). In this 15 format, probes, such as specific antibodies, are used to monitor the differential expression or level of activity of the protein in the different cell populations or body fluids. Cell lines or populations or body fluids are exposed to the agent to be tested under appropriate conditions and time. Cellular lysates or body fluids can be prepared from the exposed cell line or population and a control, 20 unexposed cell line or population or unexposed body fluid. The cellular lysates or body fluids are then analyzed with the probe.

For example, N- and C-terminal fragments of the CVSP14 can be 25 expressed in bacteria and used to search for proteins which bind to these fragments. Fusion proteins, such as His-tag or GST fusion to the N- or C-terminal regions of the CVSP14 can be prepared for use as a substrate. These fusion proteins can be coupled to, for example, Glutathione-Sepharose beads and then probed with cell lysates or body fluids. Prior to lysis, the cells or body fluids can be treated with a candidate agent which can modulate a CVSP14 or 30 proteins that interact with domains thereon. Lysate proteins binding to the fusion proteins can be resolved by SDS-PAGE, isolated and identified by protein sequencing or mass spectroscopy, as is known in the art.

-72-

Antibody probes are prepared by immunizing suitable mammalian hosts in appropriate immunization protocols using the peptides, polypeptides or proteins if they are of sufficient length (e.g., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 or more consecutive amino acids the CVSP14 polypeptide or if required to enhance immunogenicity, conjugated to suitable carriers. Methods for preparing immunogenic conjugates with carriers, such as bovine serum albumin (BSA), keyhole limpet hemocyanin (KLH), or other carrier proteins are well known in the art. In some circumstances, direct conjugation using, for example, carbodiimide reagents can be effective; in other instances linking reagents such as those supplied by Pierce Chemical Co., Rockford, IL, can be desirable to provide accessibility to the hapten. Hapten peptides can be extended at either the amino or carboxy terminus with a Cys residue or interspersed with cysteine residues, for example, to facilitate linking to a carrier. Administration of the immunogens is conducted generally by injection over a suitable time period and with use of suitable adjuvants, as is generally understood in the art. During the immunization schedule, titers of antibodies are taken to determine adequacy of antibody formation.

Anti-peptide antibodies can be generated using synthetic peptides corresponding to, for example, the carboxy terminal amino acids of the CVSP14. Synthetic peptides can be as small as 1-3 amino acids in length, generally at least 4 or more amino acid residues long. The peptides can be coupled to KLH using standard methods and can be immunized into animals, such as rabbits or ungulate. Polyclonal antibodies can then be purified, for example using Actigel beads containing the covalently bound peptide.

While the polyclonal antisera produced in this way can be satisfactory for some applications, for pharmaceutical compositions, use of monoclonal preparations are generally used. Immortalized cell lines which secrete the desired monoclonal antibodies can be prepared using the standard method of Kohler *et al.*, (*Nature* 256: 495-7 (1975)) or modifications which effect immortalization of lymphocytes or spleen cells, as is generally known. The immortalized cell lines secreting the desired antibodies are screened by immunoassay in which the antigen is the peptide hapten, polypeptide or protein.

-73-

When the appropriate immortalized cell culture secreting the desired antibody is identified, the cells can be cultured either *in vitro* or by production *in vivo* via ascites fluid. Of particular interest, are monoclonal antibodies that recognize the catalytic domain of the a CVSP14.

5 Additionally, the zymogen or two-chain form of the CVSP14 can be used to make monoclonal antibodies that recognize conformation epitopes. The desired monoclonal antibodies are then recovered from the culture supernatant or from the ascites supernatant. Fragments of the monoclonals or the polyclonal antisera which contain the immunologically significant portion can be used as
10 antagonists, as well as the intact antibodies. Use of immunologically reactive fragments, such as the Fab, Fab', or F(ab')₂ fragments are often used, especially in a therapeutic context, as these fragments are generally less immunogenic than the whole immunoglobulin.

15 The antibodies or fragments can also be produced. Regions that bind specifically to the desired regions of receptor also can be produced in the context of chimeras with multiple species origin.

Agents that are assayed in the above method can be randomly selected or rationally selected or designed.

20 The agents can be, as examples, peptides, small molecules, and carbohydrates. A skilled artisan can readily recognize that there is no limit as to the structural nature of the agents.

25 The peptide agents can be prepared using standard solid phase (or solution phase) peptide synthesis methods, as is known in the art. In addition, the DNA encoding these peptides can be synthesized using commercially available oligonucleotide synthesis instrumentation and produced recombinantly using standard recombinant production systems. The production using solid phase peptide synthesis is necessitated if non-gene-encoded amino acids are to be included.

G. Assay formats and selection of test substances that modulate at least one activity of a CVSP14 polypeptide

Methods for identifying agents that modulate at least one activity of a CVSP14 are provided. The methods include phage display and other methods 5 for assessing alterations in the activity of a CVSP14. Such methods or assays can use any means of monitoring or detecting the desired activity. A variety of formats and detection protocols are known for performing screening assays. Any such formats and protocols can be adapted for identifying modulators of 10 CVSP14 polypeptide activities. The following includes a discussion of exemplary protocols.

1. High throughput screening assays

Although the above-described assay can be conducted where a single CVSP14 polypeptide is screened, and/or a single test substance is screened in one assay, the assay typically is conducted in a high throughput screening 15 mode, *i.e.*, a plurality of the SP proteins are screened against and/or a plurality of the test substances are screened simultaneously (*See generally, High Throughput Screening: The Discovery of Bioactive Substances* (Devlin, Ed.) Marcel Dekker, 1997; Sittampalam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1:384-91 (1997); and Silverman et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:397-403 (1998)). For 20 example, the assay can be conducted in a multi-well (e.g., 24-, 48-, 96-, 384-, 1536-well or higher density), chip or array format.

High-throughput screening (HTS) is the process of testing a large number of diverse chemical structures against disease targets to identify "hits" (Sittampalam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1:384-91 (1997)). Current state-of- 25 the-art HTS operations are highly automated and computerized to handle sample preparation, assay procedures and the subsequent processing of large volumes of data.

Detection technologies employed in high-throughput screens depend on the type of biochemical pathway being investigated (Sittampalam et al., *Curr. 30 Opin. Chem. Biol.*, 1:384-91 (1997)). These methods include, radiochemical methods, such as the scintillation proximity assays (SPA), which can be adapted to a variety of enzyme assays (Lerner et al., *J. Biomol. Screening*, 1:135-143

-75-

(1996); Baker et al., *Anal. Biochem.*, 239:20-24 (1996); Baum et al., *Anal. Biochem.*, 237:129-134 (1996); and Sullivan et al., *J. Biomol. Screening* 2:19-23 (1997)) and protein-protein interaction assays (Braunwalder et al., *J. Biomol. Screening* 1:23-26 (1996); Sonatore et al., *Anal. Biochem.* 240:289-297 (1996); 5 and Chen et al., *J. Biol. Chem.* 271:25308-25315 (1996)), and non-isotopic detection methods, including but are not limited to, colorimetric and luminescence detection methods, resonance energy transfer (RET) methods, time-resolved fluorescence (HTRF) methods, cell-based fluorescence assays, such as fluorescence resonance energy transfer (FRET) procedures (see, 10 e.g., Gonzalez et al., *Biophys. J.*, 69:1272-1280 (1995)), fluorescence polarization or anisotropy methods (see, e.g., Jameson et al., *Methods Enzymol.* 246:283-300 (1995); Jolley, *J. Biomol. Screening* 1:33-38 (1996); Lynch et al., *Anal. Biochem.* 247:77-82 (1997)), fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and other such methods.

15 2. Test Substances

Test compounds, including small molecules, antibodies, proteins, nucleic acids, peptides, and libraries and collections thereof, can be screened in the above-described assays and assays described below to identify compounds that modulate the activity of a CVSP14 polypeptide. Rational drug design 20 methodologies that rely on computational chemistry can be used to screen and identify candidate compounds.

The compounds identified by the screening methods include inhibitors, including antagonists, and can be agonists. Compounds for screening include 25 any compounds and collections of compounds available, known or that can be prepared.

a. Selection of Compounds

Compounds can be selected for their potency and selectivity of inhibition 30 of serine proteases, especially a CVSP14 polypeptide. As described herein, and as generally known, a target serine protease and its substrate are combined under assay conditions permitting reaction of the protease with its substrate. The assay is performed in the absence of test compound, and in the presence of increasing concentrations of the test compound. The concentration of test

-76-

compound at which 50% of the serine protease activity is inhibited by the test compound is the IC_{50} value (Inhibitory Concentration) or EC_{50} (Effective Concentration) value for that compound. Within a series or group of test compounds, those having lower IC_{50} or EC_{50} values are considered more potent

5 inhibitors of the serine protease than those compounds having higher IC_{50} or EC_{50} values. The IC_{50} measurement is often used for more simplistic assays, whereas the EC_{50} is often used for more complicated assays, such as those employing cells.

Typically candidate compounds have an IC_{50} value of 100 nM or less as measured in an *in vitro* assay for inhibition of CVSP14 polypeptide activity. The test compounds also are evaluated for selectivity toward a serine protease. As described herein, and as generally known, a test compound is assayed for its potency toward a panel of serine proteases and other enzymes and an IC_{50} value or EC_{50} value is determined for each test compound in each assay system. A 15 compound that demonstrates a low IC_{50} value or EC_{50} value for the target enzyme, *e.g.*, CVSP14 polypeptide, and a higher IC_{50} value or EC_{50} value for other enzymes within the test panel (*e.g.*, urokinase tissue plasminogen activator, thrombin, Factor Xa), is considered to be selective toward the target enzyme. Generally, a compound is deemed selective if its IC_{50} value or EC_{50} 20 value in the target enzyme assay is at least one order of magnitude less than the next smallest IC_{50} value or EC_{50} value measured in the selectivity panel of enzymes.

Compounds are also evaluated for their activity *in vivo*. The type of assay chosen for evaluation of test compounds depends on the pathological 25 condition to be treated or prevented by use of the compound, as well as the route of administration to be evaluated for the test compound.

For instance, to evaluate the activity of a compound to reduce tumor growth through inhibition of CVSP14 polypeptide, the procedures described by Jankun et al., *Canc. Res.* 57:559-563 (1997) to evaluate PAI-1 can be 30 employed. Briefly, the ATCC cell lines DU145 and LnCaP are injected into SCID mice. After tumors are established, the mice are given test compound according to a dosing regime determined from the compound's *in vitro* characteristics. The

-77-

Jankun *et al.* compound was administered in water. Tumor volume measurements are taken twice a week for about five weeks. A compound is deemed active if an animal to which the compound was administered exhibited decreased tumor volume, as compared to animals receiving appropriate control 5. compounds.

Another *in vivo* experimental model designed to evaluate the effect of p-aminobenzamidine, a swine protease inhibitor, on reducing tumor volume is described by Billström *et al.*, *Int. J. Cancer* 61:542-547 (1995).

To evaluate the ability of a compound to reduce the occurrence of, or 10 inhibit, metastasis, the procedures described by Kobayashi *et al.* *Int. J. Canc.* 57:727-733d (1994) can be employed. Briefly, a murine xenograft selected for high lung colonization potential is injected into C57B1/6 mice i.v. (experimental metastasis) or s.c. into the abdominal wall (spontaneous metastasis). Various 15 concentrations of the compound to be tested can be admixed with the tumor cells in Matrigel prior to injection. Daily i.p. injections of the test compound are made either on days 1-6 or days 7-13 after tumor inoculation. The animals are sacrificed about three or four weeks after tumor inoculation, and the lung tumor colonies are counted. Evaluation of the resulting data permits a determination as to efficacy of the test compound, optimal dosing and route of administration.

20 The activity of the tested compounds toward decreasing tumor volume and metastasis can be evaluated in model described in Rabbani *et al.*, *Int. J. Cancer* 63:840-845 (1995) to evaluate their inhibitor. There, Mat LyLu tumor cells were injected into the flank of Copenhagen rats. The animals were 25 implanted with osmotic minipumps to continuously administer various doses of test compound for up to three weeks. The tumor mass and volume of experimental and control animals were evaluated during the experiment, as were metastatic growths. Evaluation of the resulting data permits a determination as to efficacy of the test compound, optimal dosing, and route of administration. Some of these authors described a related protocol in Xing *et al.*, *Canc. Res.*

30 57:3585-3593 (1997).

To evaluate the anti-angiogenesis activity of a compound, a rabbit cornea neovascularization model can be employed (see, e.g., Avery *et al.* (1990) *Arch.*

-78-

Ophthalmol., 108:1474-147). Avery *et al.* describes anesthetizing New Zealand albino rabbits and then making a central corneal incision and forming a radial corneal pocket. A slow release prostaglandin pellet was placed in the pocket to induce neovascularization. Test compound was administered i.p. for five days, 5 at which time the animals were sacrificed. The effect of the test compound is evaluated by review of periodic photographs taken of the limbus, which can be used to calculate the area of neovascular response and, therefore, limbal neovascularization. A decreased area of neovascularization as compared with appropriate controls indicates the test compound was effective at decreasing or 10 inhibiting neovascularization.

An angiogenesis model used to evaluate the effect of a test compound in preventing angiogenesis is described by Min *et al.* *Canc. Res.* 56:2428-2433 (1996). C57BL6 mice receive subcutaneous injections of a Matrigel mixture containing bFGF, as the angiogenesis-inducing agent, with and without the test 15 compound. After five days, the animals are sacrificed and the Matrigel plugs, in which neovascularization can be visualized, are photographed. An experimental animal receiving Matrigel and an effective dose of test compound exhibits less vascularization than a control animal or an experimental animal receiving a less- or non-effective dose of compound.

20 An *in vivo* system designed to test compounds for their ability to limit the spread of primary tumors is described by Crowley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5021-5025 (1993). Nude mice are injected with tumor cells (PC3) engineered to express CAT (chloramphenicol acetyltransferase). Compounds to be tested for their ability to decrease tumor size and/or metastases are 25 administered to the animals, and subsequent measurements of tumor size and/or metastatic growths are made. In addition, the level of CAT detected in various organs provides an indication of the ability of the test compound to inhibit metastasis; detection of less CAT in tissues of a treated animal versus a control animal indicates less CAT-expressing cells migrated to that tissue.

30 *In vivo* experimental models designed to evaluate the inhibitory potential of a test serine protease inhibitor, using a tumor cell line F3II known to be highly invasive (see, e.g., Alonso *et al.*, *Breast Canc. Res. Treat.* 40:209-223

-79-

(1996)). Alonso describes *in vivo* studies for toxicity determination, tumor growth, invasiveness, spontaneous metastasis, experimental lung metastasis, and an angiogenesis assay.

The CAM model (chick embryo chorioallantoic membrane model), first 5 described by L. Ossowski in 1998 (*J. Cell Biol.* 107:2437-2445 (1988)), provides another method for evaluating the inhibitory activity of a test compound. In the CAM model, tumor cells invade through the chorioallantoic membrane containing CAM with tumor cells in the presence of several serine protease inhibitors results in less or no invasion of the tumor cells through the 10 membrane. Thus, the CAM assay is performed with CAM and tumor cells in the presence and absence of various concentrations of test compound. The invasiveness of tumor cells is measured under such conditions to provide an indication of the compound's inhibitory activity. A compound having inhibitory activity correlates with less tumor invasion.

15 The CAM model is also used in a standard assay of angiogenesis (*i.e.*, effect on formation of new blood vessels (Brooks *et al. Methods in Molecular Biology* 129:257-269 (1999)). According to this model, a filter disc containing an angiogenesis inducer, such as basic fibroblast growth factor (bFGF) is placed onto the CAM. Diffusion of the cytokine into the CAM induces local 20 angiogenesis, which can be measured in several ways such as by counting the number of blood vessel branch points within the CAM directly below the filter disc. The ability of identified compounds to inhibit cytokine-induced angiogenesis can be tested using this model. A test compound can either be added to the filter disc that contains the angiogenesis inducer, be placed directly 25 on the membrane or be administered systemically. The extent of new blood vessel formation in the presence and/or absence of test compound can be compared using this model. The formation of fewer new blood vessels in the presence of a test compound would be indicative of anti-angiogenesis activity.

WO 02/077263

PCT/US02/09939

-80-

Demonstration of anti-angiogenesis activity for inhibitors of a CVSP14 polypeptide indicates a role in angiogenesis for that SP protein.

b. Known serine protease inhibitors

Compounds for screening can be serine protease inhibitors, which can be tested for their ability to inhibit the activity of a CVSP14.

Exemplary, serine protease inhibitors for use in the screening assays, include, but are not limited to: Serine Protease Inhibitor 3 (SPI-3) (Chen, *et al.* *Cytokine*, 17:856-862 (1999)); Aprotinin (Iijima, R., *et al.*, *J. Biochem. (Tokyo)* 126:912-916 (1999)); Kazal-type serine protease inhibitor-like proteins (Niimi, *et al.* *Eur. J. Biochem.*, 266:282-292 (1999)); Kunitz-type serine protease inhibitor (Ravichandran, S., *et al.*, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 55:1814-1821 (1999)); Tissue factor pathway inhibitor-2/Matrix-associated serine protease inhibitor (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)); Nafmostat mesilate (Ryo, R. *et al.* *Vox Sang.* 76:241-6 (1999)); TPCK (Huang *et al.* *Oncogene* 18:3431-3439 (1999)); A synthetic cotton-bound serine protease inhibitor (Edwards *et al.* *Wound Repair Regen.* 7:106-18 (1999)); FUT-175 (Sawada, M. *et al.* *Stroke* 30:644-50 (1999)); Combination of serine protease inhibitor FUT-0175 and thromboxane synthetase inhibitor OKY-046 (Kaminogo *et al.* *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 38:704-8; discussion 708-9 (1998)); The rat serine protease inhibitor 2.1 gene (LeCam, A., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253:311-4 (1998)); A new intracellular serine protease inhibitor expressed in the rat pituitary gland complexes with granzyme B (Hill *et al.* *FEBS Lett.* 440:361-4 (1998)); 3,4-Dichloroisocoumarin (Hammed *et al.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 219:132-7 (1998)); LEX032 (Bains *et al.* *Eur. J. Pharmacol.* 356:67-72 (1998)); N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (Dryjanski *et al.* *Biochemistry* 37:14151-6 (1998)); Mouse gene for the serine protease inhibitor neuroserpin (P112) (Berger *et al.* *Gene*, 214:25-33 (1998)); Rat serine protease inhibitor 2.3 gene (Paul *et al.* *Eur. J. Biochem.* 264:538-46 (1998)); Ecotin (Yang *et al.* *J. Mol. Biol.* 279:945-57 (1998)); A 14 kDa plant-related serine protease inhibitor (Roch *et al.* *Dev. Comp. Immunol.* 22(1):1-12 (1998)); Matrix-associated serine protease inhibitor TFPI-2/33 kDa MSPI (Rao *et al.* *Dev. Comp. Immunol.* 22(1):1-12 (1998));

- al. *Int. J. Cancer* 76:749-56 (1998)); ONO-3403 (Hiwasa et al. *Cancer Lett.* 126:221-5 (1998)); Bdellastasin (Moser et al. *Eur. J. Biochem.* 253:212-20 (1998)); Bikunin (Xu et al. *J. Mol. Biol.* 276:955-66 (1998)); Nafamostat mesilate (Meijgren et al. *Thromb. Haemost.* 79:342-7 (1998)); The growth 5. hormone dependent serine protease inhibitor, Spi 2.1 (Maake et al. *Endocrinology* 138:5630-6 (1997)); Growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor (Kawaguchi et al. *J. Biol. Chem.*, 272:27558-64 (1997)); Heat-stable serine protease inhibitor protein from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Hamdaoui et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238:357-60 (1997)); Human placental Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a Kunitz-type serine protease inhibitor (Shimomura et al. *J. Biol. Chem.* 272:6370-6 (1997)); FUT-187, oral serine protease inhibitor (Shiozaki et al. *Gan To Kagaku Ryoho*, 23(14): 1971-9 (1996)); Extracellular matrix-associated serine protease inhibitors (Mr 33,000, 31,000, and 27,000 10 15 (Rao, C.N., et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 335:82-92 (1996)); An irreversible isocoumarin serine protease inhibitor (Palencia, D.D., et al., *Biol. Reprod.*, 55:536-42 (1996)); 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) (Nakabo et al. *J. Leukoc. Biol.* 60:328-36 (1996)); Neuroserpin (Osterwalder, T., et al., *EMBO J.* 15:2944-53 (1996)); Human serine protease inhibitor alpha-1- 20 antitrypsin (Forney et al. *J. Parasitol.* 82:496-502 (1996)); Rat serine protease inhibitor 2.3 (Simar-Blanchet, A.E., et al., *Eur. J. Biochem.*, 236:638-48 (1996)); Gebaxate mesilate (parodi, F., et al., *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 10:235-7 (1996)); Recombinant serine protease inhibitor, CPTI II (Stankiewicz, M., et al., *Acta Biochim. Pol.*, 43(3):525-9 (1996)); A cysteine-rich serine protease 25 inhibitor (Guamerin II) (Kim, D.R., et al., *J. Enzym. Inhib.*, 10:81-91 (1996)); Diisopropylfluorophosphate (Lundqvist, H., et al., *Inflamm. Res.*, 44(12):510-7 (1995)); Nexin 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)); Protease nexin 1 (Houenou, L.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(3):895-9 (1995)); 30 Chymase-directed serine protease inhibitor (Woodard S.L., et al., *J. Immunol.*, 153(11):5016-25 (1994)); N-alpha-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone (TLCK) (Bourinbaiar, A.S., et al., *Cell Immunol.*, 155(1):230-6 (1994)); Smipi56

- (Ghendler, Y., et al., *Exp. Parasitol.*, 78(2):121-31 (1994)); Schistosoma haematobium serine protease (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));
- 5 Antithrombin 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)); Camostat mesilate (Senda, S., et al., *Intern. Med.*, 32(4):350-4 (1993)); Pigment epithelium-derived factor (Steele, F.R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(4):1526-30 (1993)); Antistatin (Holstein, T.W., et al., *FEBS Lett.*, 309(3):288-92 (1992)); The vaccinia virus K2L gene encodes a serine protease inhibitor (Zhou, J., et al., *Virology*, 189(2):678-86 (1992)); Bowman-Birk serine-protease inhibitor (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));
- 10 PAI-1 (Yreadwell, B.V., et al., *J. Orthop. Res.*, 9(3):309-16 (1991)); 3,4-Dichloroisocoumarin (Rusbridge, N.M., et al., *FEBS Lett.*, 268(1):133-6 (1990)); Alpha 1-antichymotrypsin (Lindmark, B.E., et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141(4 Pt 1):884-8 (1990)); P-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) (Scuderi, P., *J. Immunol.*, 143(1):168-73 (1989)); Alpha 1-antichymotrypsin (Abraham, C.R., et al., *Cell*, 52(4):487-501 (1988)); Contrapsin (Modha, J., et al., *Parasitology*, 96 (Pt 1):99-109 (1988)); Alpha 2-antiplasmin (Holmes, W.E., et al., *J. Biol. Chem.*, 262(4):1659-64 (1987)); 3,4-dichloroisocoumarin (Harper, J.W., et al., *Biochemistry*, 24(8):1831-41 (1985)); Diisopropylfluorophosphate (Tsutsui, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123(1):271-7 (1984));
- 15 Gabexate mesilate (Hesse, B., et al., *Pharmacol. Res. Commun.*, 16(7):637-45 (1984)); Phenyl methyl sulfonyl fluoride (Dufer, J., et al., *Scand. J. Haematol.*, 32(1):25-32 (1984)); Protease inhibitor CI-2 (McPhalen, C.A., et al., *J. Mol. Biol.*, 168(2):445-7 (1983)); Phenylmethylsulfonyl fluoride (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).

c. Combinatorial libraries and other libraries

The source of compounds for the screening assays, can be libraries, including, but are not limited to, combinatorial libraries. Methods for synthesizing combinatorial libraries and characteristics of such combinatorial libraries are known in the art (See generally, *Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential* (Cortese Ed.) Walter de Gruyter, Inc., 1995; Tietze and Lieb, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2(3):363-71 (1998); Lam, *Anticancer Drug Des.*, 12(3):145-67 (1997); Blaney and Martin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1(1):54-9 (1997); and Schultz and Schultz, *Biotechnol. Prog.*, 12(6):729-43 (1996)).

Methods and strategies for generating diverse libraries, primarily peptide- and nucleotide-based oligomer libraries, have been developed using molecular biology methods and/or simultaneous chemical synthesis methodologies (see, e.g., Dower et al., *Annu. Rep. Med. Chem.*, 26:271-280 (1991); Fodor et al., *Science*, 251:767-773 (1991); Jung et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31:367-383 (1992); Zuckerman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4505-4509 (1992); Scott et al., *Science*, 249:386-390 (1990); Devlin et al., *Science*, 249:404-406 (1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); and Gallop et al., *J. Medicinal Chemistry*, 37:1233-1251 (1994)). The resulting combinatorial libraries potentially contain millions of compounds and that can be screened to identify compounds that exhibit a selected activity.

The libraries fall into roughly three categories: fusion-protein-displayed peptide libraries in which random peptides or proteins are presented on the surface of phage particles or proteins expressed from plasmids; support-bound synthetic chemical libraries in which individual compounds or mixtures of compounds are presented on insoluble matrices, such as resin beads (see, e.g., Lam et al., *Nature*, 354:82-84 (1991)) and cotton supports (see, e.g., Eichler et al., *Biochemistry* 32:11035-11041 (1993)); and methods in which the compounds are used in solution (see, e.g., Houghten et al., *Nature*, 354:84-86 (1991); Houghten et al., *BioTechniques*, 13:412-421 (1992); and Scott et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:40-48 (1994)). There are numerous examples of synthetic peptide and oligonucleotide combinatorial libraries and there are many

-84-

methods for producing libraries that contain non-peptidic small organic molecules. Such libraries can be based on basis set of monomers that are combined to form mixtures of diverse organic molecules or that can be combined to form a library based upon a selected pharmacophore monomer.

- 5 Either a random or a deterministic combinatorial library can be screened by the presently disclosed and/or claimed screening methods. In either of these two libraries, each unit of the library is isolated and/or immobilized on a solid support. In the deterministic library, one knows *a priori* a particular unit's location on each solid support. In a random library, the location of a particular
10 unit is not known *a priori* although each site still contains a single unique unit. Many methods for preparing libraries are known to those of skill in this art (see, e.g., Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3998-4002 (1984), Houghten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5131-5135 (1985)). Combinatorial library generated by the any techniques known to those of skill in
15 the art are contemplated (see, e.g., Table 1 of Schultz and Schultz, *Biotechnol. Prog.*, 12(6):729-43 (1996)) for screening; Bartel et al., *Science*, 261:1411-1418 (1993); Baumbach et al. *BioPharm*, Can:24-35 (1992); Bock et al., *Nature*, 355:564-566 (1992); Borman, S., Combinatorial chemists focus on small molecules molecular recognition, and automation, *Chem. Eng. News*,
20 2(12):29 (1996); Boublik, et al., Eukaryotic Virus Display: Engineering the Major Surface Glycoproteins of the *Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus* (ACNPV) for the Presentation of Foreign Proteins on the Virus Surface, *Bio/Technology*, 13:1079-1084 (1995); Brenner, et al., Encoded Combinatorial Chemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5381-5383 (1992); Caflisch, et al.,
25 Computational Combinatorial Chemistry for *De Novo* Ligand Design: Review and Assessment, *Perspect. Drug Discovery Des.*, 3:51-84 (1995); Cheng, et al., Sequence-Selective Peptide Binding with a Peptido-A,B-*trans*-steroidal Receptor Selected from an Encoded Combinatorial Library, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:1813-1814 (1996); Chu, et al., Affinity Capillary Electrophoresis to Identify the
30 Peptide in A Peptide Library that Binds Most Tightly to Vancomycin, *J. Org. Chem.*, 58:648-652 (1993); Clackson, et al., Making Antibody Fragments Using Phage Display Libraries, *Nature*, 352:624-628 (1991); Combs, et al., Protein

- Structure-Based Combinatorial Chemistry: Discovery of Non-Peptide Binding Elements to Src SH3 Domain, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:287-288 (1996); Cwirla, et al., Peptides On Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:6378-6382 (1990); Ecker, et al., Combinatorial 5 Drug Discovery: Which Method will Produce the Greatest Value, *Bio/Technology*, 13:351-360 (1995); Ellington, et al., *In Vitro* Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands, *Nature*, 346:818-822 (1990); Ellman, J.A., Variants of Benzodiazepines, *J. Am. Chem. Soc.*, 114:10997 (1992); Erickson, et al., *The Proteins*; Neurath, H., Hill, R.L., Eds.: Academic: New York, 10 1976; pp. 255-257; Felici, et al., *J. Mol. Biol.*, 222:301-310 (1991); Fodor, et al., Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis, *Science*, 251:767-773 (1991); Francisco, et al., Transport and Anchoring of Beta-Lactamase to the External Surface of *E. Coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:2713-2717 (1992); Georgiou, et al., Practical Applications of Engineering 15 Gram-Negative Bacterial Cell Surfaces, *TIBTECH*, 11:6-10 (1993); Geysen, et al., Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3998-4002 (1984); Glaser, et al., Antibody Engineering by Condon-Based Mutagenesis in a Filamentous Phage Vector System, *J. Immunol.*, 149:3903-3913 (1992); Gram, et al., In 20 vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naïve combinatorial immunoglobulin library, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:3576-3580 (1992); Han, et al., Liquid-Phase Combinatorial Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:6419-6423 (1995); Hoogenboom, et al., Multi-Subunit Proteins on the Surface of Filamentous Phage: Methodologies for Displaying Antibody (Fab) 25 Heavy and Light Chains, *Nucleic Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991); Houghten, et al., General Method for the Rapid Solid-Phase Synthesis of Large Numbers of Peptides: Specificity of Antigen-Antibody Interaction at the Level of Individual Amino Acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:5131-5135 (1985); Houghten, et al., The Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for the Determination 30 of Peptide Ligands in Radio-Receptor Assays-Opiod-Peptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:405-412 (1993); Houghten, et al., Generation and Use of Synthetic Peptide Combinatorial Libraries for Basic Research and Drug Discovery,

- Nature*, 354:84-86 (1991); Huang, et al., Discovery of New Ligand Binding Pathways in Myoglobin by Random Mutagenesis, *Nature Struct. Biol.*, 1:226-229 (1994); Huse, et al., Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire In Phage Lambda, *Science*, 246:1275-1281 (1989);
- 5 Janda, K.D., New Strategies for the Design of Catalytic Antibodies, *Biotechnol. Prog.*, 6:178-181 (1990); Jung, et al., Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31:367-486 (1992); Kang, et al., Linkage of Recognition and Replication Functions By Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:4363-4366 (1991a); Kang, et al., Antibody Redesign by Chain Shuffling from Random Combinatorial Immunoglobulin Libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:11120-11123 (1991b); Kay, et al., An M13 Phage Library Displaying Random 38-Amino-Acid-Peptides as a Source of Novel Sequences with Affinity to Selected Targets Genes, *Gene*, 128:59-65 (1993); Lam, et al., A 10 new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, *Nature*, 354:82-84 (1991) (published errata appear in *Nature*, 358:434 (1992) and *Nature*, 360:768 (1992); Lebl, et al., One Bead One Structure Combinatorial Libraries, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 37:177-198 (1995); Lerner, et al., Antibodies without Immunization, *Science*, 258:1313-1314 (1992); Li, et al., Minimization 15 of a Polypeptide Hormone, *Science*, 270:1657-1660 (1995); Light, et al., Display of Dimeric Bacterial Alkaline Phosphatase on the Major Coat Protein of Filamentous Bacteriophage, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:1073-1079 (1992); Little, et al., Bacterial Surface Presentation of Proteins and Peptides: An Alternative to Phage Technology, *Trends Biotechnol.*, 11:3-5 (1993); Marks, et 20 al., By-Passing Immunization. Human Antibodies from V-Gene Libraries Displayed on Phage, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Matthews, et al., Substrate Phage: Selection of Protease Substrates by Monovalent Phage Display, *Science*, 260:1113-1117 (1993); McCafferty, et al., Phage Enzymes: Expression and Affinity Chromatography of Functional Alkaline Phosphatase on the Surface 25 of Bacteriophage, *Protein Eng.*, 4:955-961 (1991); Menger, et al., Phosphatase Catalysis Developed Via Combinatorial Organic Chemistry, *J. Org. Chem.*, 60:6666-6667 (1995); Nicolaou, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34:2289-30

- 2291 (1995); Oldenburg, et al., Peptide Ligands for A Sugar-Binding Protein Isolated from a Random Peptide Library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5393-5397 (1992); Parmley, et al., Antibody-Selectable Filamentous fd Phage Vectors: Affinity Purification of Target Genes, *Genes*, 73:305-318 (1988); Pinilla, et al., Synthetic Peptide Combinatorial Libraries (SPCLS)-Identification of the Antigenic Determinant of Beta-Endorphin Recognized by Monoclonal Antibody-3E7, *Gene*, 128:71-76 (1993); Pinilla, et al., Review of the Utility of Soluble Combinatorial Libraries, *Biopolymers*, 37:221-240 (1995); Pistor, et al., Expression of Viral Hemagglutinin On the Surface of *E. Coli*, *Klin. Wochenschr.*, 66:110-116 (1989); Pollack, et al., Selective Chemical Catalysis by an Antibody, *Science*, 234:1570-1572 (1986); Rigler, et al., Fluorescence Correlations, Single Molecule Detection and Large Number Screening: Applications in Biotechnology, *J. Biotechnol.*, 41:177-186 (1995); Sarvetnick, et al., Increasing the Chemical Potential of the Germ-Line Antibody Repertoire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:4008-4011 (1993); Sastry, et al., Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia Coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:5728-5732 (1989); Scott, et al., Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library, *Science*, 249:386-390 (1990); Sears, et al., Engineering Enzymes for Bioorganic Synthesis: Peptide Bond Formation, *Biotechnol. Prog.*, 12:423-433 (1996); Simon, et. al., Peptides: A Modular Approach to Drug Discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:9367-9371 (1992); Still, et al., Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using Encoded Combinatorial Libraries, *Acc. Chem. Res.*, 29:155-163 (1996); Thompson, et al., Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries, *Chem. Rev.*, 96:555-600 (1996); Tramontano, et al., Catalytic Antibodies, *Science*, 234:1566-1570 (1986); Wrighton, et al., Small Peptides as Potent Mimetics of the Protein Hormone Erythropoietin, *Science*, 273:458-464 (1996); York, et al., Combinatorial mutagenesis of the reactive site region in plasminogen activator inhibitor I, *J. Biol. Chem.*, 266:8595-8600 (1991); Zebedee, et al., Human Combinatorial Antibody Libraries to Hepatitis B Surface Antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:3175-3179 (1992); Zuckerman, et al., Identification of

Highest-Affinity Ligands by Affinity Selection from Equimolar Peptide Mixtures Generated by Robotic Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**:4505-4509 (1992).

For example, peptides that bind to a CVSP14 polypeptide or a protease domain of an SP protein can be identified using phage display libraries. In an exemplary embodiment, this method can include a) contacting phage from a phage library with the CVSP14 polypeptide or a protease domain thereof; (b) isolating phage that bind to the protein; and (c) determining the identity of at least one peptide coded by the isolated phage to identify a peptide that binds to a CVSP14 polypeptide.

H. Modulators of the activity of CVSP14 polypeptides

Provided herein are compounds, identified by screening or produced using the CVSP14 polypeptide or protease domain in other screening methods, that modulate the activity of a CVSP14. These compounds act by directly interacting with the CVSP14 polypeptide or by altering transcription or translation thereof. Such molecules include, but are not limited to, antibodies that specifically react with a CVSP14 polypeptide, particularly with the protease domain thereof, antisense nucleic acids or double-stranded RNA (dsRNA) such as RNAi, that alter expression of the CVSP14 polypeptide, antibodies, peptide mimetics and other such compounds.

1. Antibodies

Antibodies, including polyclonal and monoclonal antibodies, that specifically bind to the CVSP14 polypeptide provided herein, particularly to the single chain protease domains thereof or the activated forms of the full-length or protease domain or the zymogen form, are provided.

Generally, the antibody is a monoclonal antibody, and typically the antibody specifically binds to the protease domain of the CVSP14 polypeptide. In particular embodiments, antibodies to each of the single chain of the protease domain of CVSP14 are provided. Also provided are antibodies that specifically bind to any domain of CVSP14 and to two chain forms thereof.

The CVSP14 polypeptide and domains, fragments, homologs and derivatives thereof can be used as immunogens to generate antibodies that

-89-

specifically bind such immunogens. Such antibodies include but are not limited to polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and an Fab expression library. In a specific embodiment, antibodies to human CVSP14 polypeptide are produced. In another embodiment, complexes formed from 5 fragments of CVSP14 polypeptide, which fragments contain the serine protease domain, are used as immunogens for antibody production.

Various procedures known in the art can be used for the production of polyclonal antibodies to CVSP14 polypeptide, its domains, derivatives, fragments or analogs. For production of the antibody, various host animals can be 10 immunized by injection with the native CVSP14 polypeptide or a synthetic version, or a derivative of the foregoing, such as a cross-linked CVSP14 polypeptide. Such host animals include but are not limited to rabbits, mice, rats, etc. Various adjuvants can be used to increase the immunological response, depending on the host species, and include but are not limited to Freund's 15 (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as bacille Calmette-Guerin (BCG) and corynebacterium parvum.

For preparation of monoclonal antibodies directed towards a CVSP14 20 polypeptide or domains, derivatives, fragments or analogs thereof, any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture can be used. Such techniques include but are not restricted to the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)), the trioma technique, the human B-cell hybridoma 25 technique (Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983)), and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., *in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). In an additional embodiment, monoclonal antibodies can be produced in 30 germ-free animals utilizing recent technology (PCT/US90/02545). Human antibodies can be used and can be obtained by using human hybridomas (Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030 (1983)), or by transforming human B cells with EBV virus *in vitro* (Cole et al., *in Monoclonal Antibodies and*

-90-

Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) by splicing the genes from a mouse antibody molecule specific for the CVSP14 polypeptide together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used.

5 Techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. patent 4,946,778) can be adapted to produce CVSP14 polypeptide-specific single chain antibodies. An additional embodiment uses the techniques described for the construction of Fab expression libraries (Huse et al., *Science* 248:1275-1281 (1989)) to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for CVSP14 polypeptide or domains, derivatives, or analogs thereof. Non-human antibodies can be "humanized" by known methods (see, e.g., U.S. Patent No. 5,225,539).

10 15 Antibody fragments that specifically bind to CVSP14 polypeptide or epitopes thereof can be generated by techniques known in the art. For example, such fragments include but are not limited to: the F(ab')2 fragment, which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments that can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')2 fragment,

20 the Fab fragments that can be generated by treating the antibody molecular with papain and a reducing agent, and Fv fragments.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, e.g., ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). To select antibodies specific to a particular domain of

25 the CVSP14 polypeptide one can assay generated hybridomas for a product that binds to the fragment of the CVSP14 polypeptide that contains such a domain

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and/or quantitation of CVSP14 polypeptide proteins, e.g., for imaging these proteins, measuring levels thereof in appropriate

30 physiological samples, in, for example, diagnostic methods. In another embodiment, anti-CVSP14 polypeptide antibodies, or fragments thereof, containing the binding domain are used as therapeutic agents.

2. Peptides, Polypeptides and Peptide Mimetics

Provided herein are methods for identifying molecules that bind to and modulate the activity of SP proteins. Included among molecules that bind to SPs, particularly the single chain protease domain or catalytically active fragments thereof, are peptides, polypeptides and peptide mimetics, including cyclic peptides. Peptide mimetics are molecules or compounds that mimic the necessary molecular conformation of a ligand or polypeptide for specific binding to a target molecule such as a CVSP14 polypeptide. In an exemplary embodiment, the peptides, peptides, polypeptides and peptide mimetics or peptide mimetics bind to the protease domain of the CVSP14 polypeptide. Such peptides and peptide mimetics include those of antibodies that specifically bind to a CVSP14 polypeptide and, typically, bind to the protease domain of a CVSP14 polypeptide. The peptides, polypeptides and peptide mimetics and peptide mimetics identified by methods provided herein can be agonists or antagonists of CVSP14 polypeptides.

Such peptides and peptide mimetics are useful for diagnosing, treating, preventing, and screening for a disease or disorder associated with CVSP14 polypeptide activity in a mammal. In addition, the peptides and peptide mimetics are useful for identifying, isolating, and purifying molecules or compounds that modulate the activity of a CVSP14 polypeptide, or specifically bind to a CVSP14 polypeptide, generally the protease domain of a CVSP14 polypeptide. Low molecular weight peptides and peptide mimetics can have strong binding properties to a target molecule, *e.g.*, a CVSP14 polypeptide or the protease domain of a CVSP14 polypeptide.

Peptides, polypeptides and peptide mimetics that bind to CVSP14 polypeptides as described herein can be administered to mammals, including humans, to modulate CVSP14 polypeptide activity. Thus, methods for therapeutic treatment and prevention of neoplastic diseases comprise administering a peptide, polypeptides or peptide mimetic compound in an amount sufficient to modulate such activity are provided. Thus, also provided herein are methods for treating a subject having such a disease or disorder in which a

-92-

peptide, polypeptides or peptide mimetic compound is administered to the subject in a therapeutically effective dose or amount.

Compositions containing the peptides, polypeptides or peptide mimetics can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In 5 therapeutic applications, compositions can be administered to a patient already suffering from a disease, as described above, in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the symptoms of the disease and its complications.

Amounts effective for this use will depend on the severity of the disease and the weight and general state of the patient and can be empirically determined.

- 10 In prophylactic applications, compositions containing the peptides, polypeptides and peptide mimetics are administered to a patient susceptible to or otherwise at risk of a particular disease. Such an amount is defined to be a "prophylactically effective dose". In this use, the precise amounts again depend on the patient's state of health and weight. Accordingly, the peptides, 15 polypeptides and peptide mimetics that bind to a CVSP14 polypeptide can be used to prepare pharmaceutical compositions containing, as an active ingredient, at least one of the peptides or peptide mimetics in association with a pharmaceutical carrier or diluent. The compounds can be administered, for example, by oral, pulmonary, parental (intramuscular, intraperitoneal, intravenous 20 (IV) or subcutaneous injection), inhalation (via a fine powder formulation), transdermal, nasal, vaginal, rectal, or sublingual routes of administration and can be formulated in dosage forms appropriate for each route of administration (see, e.g., International PCT application Nos. WO 93/25221 and WO 94/17784; and European Patent Application 613,683).
- 25 Peptides, polypeptides and peptide mimetics that bind to CVSP14 polypeptides are useful *in vitro* as unique tools for understanding the biological role of CVSP14 polypeptides, including the evaluation of the many factors thought to influence, and be influenced by, the production of CVSP14 polypeptide. Such peptides, polypeptides and peptide mimetics are also useful in 30 the development of other compounds that bind to and modulate the activity of a CVSP14 polypeptide, because such compounds provide important information on

the relationship between structure and activity that should facilitate such development.

- The peptides, polypeptides and peptide mimetics are also useful as competitive binders in assays to screen for new CVSP14 polypeptides or
- 5 CVSP14 polypeptide agonists. In such assay embodiments, the compounds can be used without modification or can be modified in a variety of ways; for example, by labeling, such as covalently or non-covalently joining a moiety which directly or indirectly provides a detectable signal. In any of these assays, the materials thereto can be labeled either directly or indirectly. Possibilities for .
- 10 direct labeling include label groups such as: radiolabels such as ¹²⁵I enzymes (U.S. Pat. No. 3,645,090) such as peroxidase and alkaline phosphatase, and fluorescent labels (U.S. Pat. No. 3,940,475) capable of monitoring the change in fluorescence intensity, wavelength shift, or fluorescence polarization.
- Possibilities for indirect labeling include biotinylation of one constituent followed
- 15 by binding to avidin coupled to one of the above label groups. The compounds can also include spacers or linkers in cases where the compounds are to be attached to a solid support.

Moreover, based on their ability to bind to a CVSP14 polypeptide, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can be used as reagents for

20 detecting CVSP14 polypeptides in living cells, fixed cells, in biological fluids, in tissue homogenates and in purified, natural biological materials. For example, by labelling such peptides, polypeptides and peptide mimetics, cells having CVSP14 polypeptides can be identified. In addition, based on their ability to bind a CVSP14 polypeptide, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can

25 be used in *in situ* staining, FACS (fluorescence-activated cell sorting), Western blotting, ELISA and other analytical protocols. Based on their ability to bind to a CVSP14 polypeptide, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can be used in purification of CVSP14 polypeptide polypeptides or in purifying cells expressing the CVSP14 polypeptide polypeptides, e.g., a polypeptide encoding

30 the protease domain of a CVSP14 polypeptide.

The peptides, polypeptides and peptide mimetics can also be used as commercial reagents for various medical research and diagnostic uses. The

-94-

activity of the peptides and peptide mimetics can be evaluated either *in vitro* or *in vivo* in one of the numerous models described in McDonald (1992) *Am. J. of Pediatric Hematology/Oncology*, 14:8-21.

3. Peptide, polypeptides and peptide mimetic therapy

- 5 Peptide analogs are commonly used in the pharmaceutical industry as non-peptide drugs with properties analogous to those of the template peptide. These types of non-peptide compounds are termed "peptide mimetics" or "peptidomimetics" (Luthman *et al.*, *A Textbook of Drug Design and Development*, 14:386-406, 2nd Ed., Harwood Academic Publishers (1996);
- 10 Joachim Grante (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:1699-1720; Fauchere (1986) *J. Adv. Drug Res.*, 15:29; Veber and Freidinger (1985) *7/NS*, p. 392; and Evans *et al.* (1987) *J. Med. Chem.*, 30:1229). Peptide mimetics that are structurally similar to therapeutically useful peptides can be used to produce an equivalent or enhanced therapeutic or prophylactic effect. Preparation of
- 15 peptidomimetics and structures thereof are known to those of skill in this art. Systematic substitution of one or more amino acids of a consensus sequence with a D-amino acid of the same type (e.g., D-lysine in place of L-lysine) can be used to generate more stable peptides. In addition, constrained peptides containing a consensus sequence or a substantially identical consensus
- 20 sequence variation can be generated by methods known in the art (Rizo *et al.* (1992) *An. Rev. Biochem.*, 61:387, incorporated herein by reference); for example, by adding internal cysteine residues capable of forming intramolecular disulfide bridges which cyclize the peptide.
- Those skilled in the art appreciate that modifications can be made to the
- 25 peptides and mimetics without deleteriously effecting the biological or functional activity of the peptide. Further, the skilled artisan would know how to design non-peptide structures in three dimensional terms, that mimic the peptides that bind to a target molecule, e.g., a CVSP14 polypeptide or, generally, the protease domain of CVSP14 polypeptides (see, e.g., Eck and Sprang (1989) *J. Biol.*
- 30 *Chem.*, 26: 17605-18795).
- When used for diagnostic purposes, the peptides and peptide mimetics can be labeled with a detectable label and, accordingly, the peptides and peptide

mimetics without such a label can serve as intermediates in the preparation of labeled peptides and peptide mimetics. Detectable labels can be molecules or compounds, which when covalently attached to the peptides and peptide mimetics, permit detection of the peptide and peptide mimetics *in vivo*, for example, in a patient to whom the peptide or peptide mimetic has been administered, or *in vitro*, e.g., in a sample or cells. Suitable detectable labels are well known in the art and include, by way of example, radioisotopes, fluorescent labels (e.g., fluorescein), and the like. The particular detectable label employed is not critical and is selected to be detectable at non-toxic levels. Selection of the such labels is well within the skill of the art.

Covalent attachment of a detectable label to the peptide or peptide mimetic is accomplished by conventional methods well known in the art. For example, when the ^{125}I radioisotope is employed as the detectable label, covalent attachment of ^{125}I to the peptide or the peptide mimetic can be achieved by incorporating the amino acid tyrosine into the peptide or peptide mimetic and then iodinating the peptide (see, e.g., Weaner *et al.* (1994) *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds*, pp. 137-140). If tyrosine is not present in the peptide or peptide mimetic, incorporation of tyrosine to the N or C terminus of the peptide or peptide mimetic can be achieved by well known chemistry. Likewise, ^{32}P can be incorporated onto the peptide or peptide mimetic as a phosphate moiety through, for example, a hydroxyl group on the peptide or peptide mimetic using conventional chemistry.

Labeling of peptidomimetics usually involves covalent attachment of one or more labels, directly or through a spacer (e.g., an amide group), to non-interfering position(s) on the peptidomimetic that are predicted by quantitative structure-activity data and/or molecular modeling. Such non-interfering positions generally are positions that do not form direct contacts with the macromolecules(s) to which the peptidomimetic binds to produce the therapeutic effect. Derivatization (e.g., labeling) of peptidomimetics should not substantially interfere with the desired biological or pharmacological activity of the peptidomimetic.

-96-

Peptides, polypeptides and peptide mimetics that can bind to a CVSP14 polypeptide or the protease domain of CVSP14 polypeptides and/or modulate the activity thereof, or exhibit CVSP14 polypeptide activity, can be used for treatment of neoplastic disease. The peptides, polypeptides and peptide mimetics can be delivered, *in vivo* or *ex vivo*, to the cells of a subject in need of treatment. Further, peptides which have CVSP14 polypeptide activity can be delivered, *in vivo* or *ex vivo*, to cells which carry mutant or missing alleles encoding the CVSP14 polypeptide gene. Any of the techniques described herein or known to the skilled artisan can be used for preparation and *in vivo* or *ex vivo* delivery of such peptides, polypeptides and peptide mimetics that are substantially free of other human proteins. For example, the peptides, polypeptides and peptide mimetics can be readily prepared by expression in a microorganism or synthesis *in vitro*.

The peptides or peptide mimetics can be introduced into cells, *in vivo* or *ex vivo*, by microinjection or by use of liposomes, for example. Alternatively, the peptides, polypeptides or peptide mimetics can be taken up by cells, *in vivo* or *ex vivo*, actively or by diffusion. In addition, extracellular application of the peptide, polypeptides or peptide mimetic can be sufficient to effect treatment of a neoplastic disease. Other molecules, such as drugs or organic compounds, that: 1) bind to a CVSP14 polypeptide or protease domain thereof; or 2) have a similar function or activity to an CVSP14 polypeptide or protease domain thereof, can be used in methods for treatment.

4. Rational drug design

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides or peptides of interest or of small molecules or peptide mimetics with which they interact (e.g., agonists and antagonists) in order to fashion drugs which are, e.g., more active or stable forms thereof; or which, for example, enhance or interfere with the function of a polypeptide *in vivo* (e.g., a CVSP14 polypeptide). In one approach, one first determines the three-dimensional structure of a protein of interest (e.g., a CVSP14 polypeptide or polypeptide having a protease domain) or, for example, of a CVSP14 polypeptide-ligand complex, by X-ray crystallography, by computer modeling or

-97-

most typically, by a combination of approaches (see, e.g., Erickson *et al.* 1990).

Also, useful information regarding the structure of a polypeptide can be gained by modeling based on the structure of homologous proteins. In addition, peptides can be analyzed by an alanine scan. In this technique, an amino acid residue is replaced by Ala, and its effect on the peptide's activity is determined. Each of the amino acid residues of the peptide is analyzed in this manner to determine the important regions of the peptide.

Also, a polypeptide or peptide that binds to a CVSP14 polypeptide or, generally, the protease domain of a CVSP14 polypeptide, can be selected by a functional assay, and then the crystal structure of this polypeptide or peptide can be determined. The polypeptide can be, for example, an antibody specific for a CVSP14 polypeptide or the protein domain of a CVSP14 polypeptide. This approach can yield a pharmacophore upon which subsequent drug design can be based. Further, it is possible to bypass the crystallography altogether by generating anti-idiotypic polypeptides or peptides, (anti-ids) to a functional, pharmacologically active polypeptide or peptide that binds to a CVSP14 polypeptide or protease domain of a CVSP14 polypeptide. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids is expected to be an analog of the original target molecule, e.g., a CVSP14 polypeptide or polypeptide having a CVSP14 polypeptide. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced banks of peptides. Selected peptides would then act as the pharmacophore.

Thus, one can design drugs which have, e.g., improved activity or stability or which act as modulators (e.g., inhibitors, agonists, antagonists) of CVSP14 polypeptide activity, and are useful in the methods, particularly the methods for diagnosis, treatment, prevention, and screening of a neoplastic disease. By virtue of the availability of cloned CVSP14 polypeptide sequences, sufficient amounts of the CVSP14 polypeptide polypeptide can be made available to perform such analytical studies as X-ray crystallography. In addition, the knowledge of the amino acid sequence of a CVSP14 polypeptide or the protease domain thereof, e.g., the protease domain encoded by the amino acid

-98-

sequence of SEQ ID Nos. 5 and 6, can provide guidance on computer modeling techniques in place of, or in addition to, X-ray crystallography.

Methods of identifying peptides and peptide mimetics that bind to CVSP14 polypeptides

5 Peptides having a binding affinity to the CVSP14 polypeptide polypeptides provided herein (e.g., a CVSP14 polypeptide or a polypeptide having a protease domain of a CVSP14 polypeptide) can be readily identified, for example, by random peptide diversity generating systems coupled with an affinity enrichment process. Specifically, random peptide diversity generating 10 systems include the "peptides on plasmids" system (see, e.g., U.S. Patent Nos. 5,270,170 and 5,338,665); the "peptides on phage" system (see, e.g., U.S. Patent No. 6,121,238 and Cwirla, *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:6378-6382); the "polysome system;" the "encoded synthetic library (ESL)" system; and the "very large scale immobilized polymer synthesis" system (see, 15 e.g., U.S. Patent No. 6,121,238; and Dower *et al.* (1991) *An. Rep. Med. Chem.* 26:271-280

For example, using the procedures described above, random peptides can generally be designed to have a defined number of amino acid residues in length (e.g., 12). To generate the collection of oligonucleotides encoding the random 20 peptides, the codon motif (NNK)^x, where N is nucleotide A, C, G, or T (equimolar; depending on the methodology employed, other nucleotides can be employed), K is G or T (equimolar), and x is an integer corresponding to the number of amino acids in the peptide (e.g., 12) can be used to specify any one of the 32 possible codons resulting from the NNK motif: 1 for each of 12 amino 25 acids, 2 for each of 5 amino acids, 3 for each of 3 amino acids, and only one of the three stop codons. Thus, the NNK motif encodes all of the amino acids, encodes only one stop codon, and reduces codon bias.

The random peptides can be presented, for example, either on the surface of a phage particle, as part of a fusion protein containing either the pIII or the 30 pVIII coat protein of a phage fd derivative (peptides on phage) or as a fusion protein with the LacI peptide fusion protein bound to a plasmid (peptides on plasmids). The phage or plasmids, including the DNA encoding the peptides, can

-99-

be identified and isolated by an affinity enrichment process using immobilized CVSP14 polypeptide polypeptide having a protease domain. The affinity enrichment process, sometimes called "panning," typically involves multiple rounds of incubating the phage, plasmids, or polysomes with the immobilized 5 CVSP14 polypeptide polypeptide, collecting the phage, plasmids, or polysomes that bind to the CVSP14 polypeptide polypeptide (along with the accompanying DNA or mRNA), and producing more of the phage or plasmids (along with the accompanying LacI-peptide fusion protein) collected.

Characteristics of peptides and peptide mimetics

10 Among the peptides, polypeptides and peptide mimetics for therapeutic application are those of having molecular weights from about 250 to about 8,000 daltons. If such peptides are oligomerized, dimerized and/or derivatized with a hydrophilic polymer (e.g., to increase the affinity and/or activity of the compounds), the molecular weights of such peptides can be substantially greater 15 and can range anywhere from about 500 to about 120,000 daltons, generally from about 8,000 to about 80,000 daltons. Such peptides can contain 9 or more amino acids that are naturally occurring or synthetic (non-naturally occurring) amino acids. One skilled in the art can determine the affinity and molecular weight of the peptides and peptide mimetics suitable for therapeutic 20 and/or diagnostic purposes (e.g., see Dower *et al.*, U.S. Patent No. 6,121,238).

The peptides can be covalently attached to one or more of a variety of hydrophilic polymers. Suitable hydrophilic polymers include, but are not limited to, polyalkylethers as exemplified by polyethylene glycol and polypropylene glycol, polylactic acid, polyglycolic acid, polyoxyalkenes, polyvinylalcohol, 25 polyvinylpyrrolidone, cellulose and cellulose derivatives, dextran and dextran derivatives. When the peptide compounds are derivatized with such polymers, their solubility and circulation half-lives can be increased with little, if any, diminishment in their binding activity. The peptide compounds can be dimerized and each of the dimeric subunits can be covalently attached to a hydrophilic 30 polymer. The peptide compounds can be PEGylated, i.e., covalently attached to polyethylene glycol (PEG).

-100-

5. Methods of preparing peptides and peptide mimetics

Peptides that bind to CVSP14 polypeptides can be prepared by classical methods known in the art, for example, by using standard solid phase techniques. The standard methods include exclusive solid phase synthesis, 5 partial solid phase synthesis methods, fragment condensation, classical solution synthesis, and even by recombinant DNA technology (see, e.g., Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149, incorporated herein by reference.)

Using the "encoded synthetic library" or "very large scale immobilized polymer synthesis" systems (see, e.g., U.S. Patent No. 5,925,525, and 10 5,902,723); the minimum size of a peptide with the activity of interest can be determined. In addition all peptides that form the group of peptides that differ from the desired motif (or the minimum size of that motif) in one, two, or more residues can be prepared. This collection of peptides then can be screened 15 ability to bind to the target molecule, e.g., and CVSP14 polypeptide or, generally, the protease domain of a CVSP14 polypeptide. This immobilized polymer synthesis system or other peptide synthesis methods can also be used to synthesize truncation analogs and deletion analogs and combinations of truncation and deletion analogs of the peptide compounds.

These procedures can also be used to synthesize peptides in which amino 20 acids other than the 20 naturally occurring, genetically encoded amino acids are substituted at one, two, or more positions of the peptide. For instance, naphthylalanine can be substituted for tryptophan, facilitating synthesis. Other synthetic amino acids that can be substituted into the peptides include L-hydroxypropyl, L-3, 4-dihydroxy-phenylalanyl, D amino acids such as 25 L-D-hydroxylysyl and D-D-methylalanyl, L- α -methylalanyl, β amino acids, and isoquinolyl. D amino acids and non-naturally occurring synthetic amino acids can also be incorporated into the peptides (see, e.g., Roberts *et al.* (1983) *Unusual Amino Acids in Peptide Synthesis*, 5(6):341-449).

The peptides can also be modified by phosphorylation (see, e.g., W. 30 Bannwarth *et al.* (1996) *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 6(17):2141-2146), and other methods for making peptide derivatives (see, e.g.,

-101-

Hruby *et al.* (1990) *Biochem. J.*, 268(2):249-262). Thus, peptide compounds also serve as a basis to prepare peptide mimetics with similar biological activity.

Those of skill in the art recognize that a variety of techniques are available for constructing peptide mimetics with the same or similar desired biological activity as the corresponding peptide compound but with more favorable activity than the peptide with respect to solubility, stability, and susceptibility to hydrolysis and proteolysis (see, e.g., Morgan *et al.* (1989) *An. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252). Methods for preparing peptide mimetics modified at the N-terminal amino group, the C-terminal carboxyl group, and/or changing one or more of the amido linkages in the peptide to a non-amido linkage are known to those of skill in the art.

10 Amino terminus modifications include, but are not limited to, alkylating, acetyating and adding a carbobenzoyl group, forming a succinimide group (see, e.g., Murray *et al.* (1995) *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5th 15 ed., Vol. 1, Manfred E. Wolf, ed., John Wiley and Sons, Inc.). C-terminal modifications include mimetics wherein the C-terminal carboxyl group is replaced by an ester, an amide or modifications to form a cyclic peptide.

In addition to N-terminal and C-terminal modifications, the peptide 20 compounds, including peptide mimetics, can advantageously be modified with or covalently coupled to one or more of a variety of hydrophilic polymers. It has been found that when peptide compounds are derivatized with a hydrophilic polymer, their solubility and circulation half-lives can be increased and their immunogenicity is masked, with little, if any, diminishment in their binding activity. Suitable nonproteinaceous polymers include, but are not limited to, 25 polyalkylethers as exemplified by polyethylene glycol and polypropylene glycol, polylactic acid, polyglycolic acid, polyoxyalkenes, polyvinylalcohol, polyvinylpyrrolidone, cellulose and cellulose derivatives, dextran and dextran derivatives. Generally, such hydrophilic polymers have an average molecular weight ranging from about 500 to about 100,000 daltons, including from about 30 2,000 to about 40,000 daltons and, from about 5,000 to about 20,000 daltons. The hydrophilic polymers also can have an average molecular weights of about 5,000 daltons, 10,000 daltons and 20,000 daltons.

-102-

Methods for derivatizing peptide compounds or for coupling peptides to such polymers have been described (see, e.g., Zalipsky (1995) *Bioc conjugate Chem.*, 6:150-166; Monfardini *et al.* (1995) *Bioc conjugate Chem.*, 6:62-69; U.S. Pat. No. 4,640,835; U.S. Pat. No. 4,496,689; U.S. Pat. No. 4,301,144; U.S. Pat. No. 4,670,417; U.S. Pat. No. 4,791,192; U.S. Pat. No. 4,179,337 and WO 95/34326, all of which are incorporated by reference in their entirety herein).

Other methods for making peptide derivatives are described, for example, in Hruby *et al.* (1990), *Biochem J.*, 268(2):249-262, which is incorporated herein by reference. Thus, the peptide compounds also serve as structural models for non-peptidic compounds with similar biological activity. Those of skill in the art recognize that a variety of techniques are available for constructing compounds with the same or similar desired biological activity as a particular peptide compound but with more favorable activity with respect to solubility, stability, and susceptibility to hydrolysis and proteolysis (see, e.g., Morgan *et al.* (1989) *An. Rep. Med. Chem.*, 24:243-252, incorporated herein by reference). These techniques include replacing the peptide backbone with a backbone composed of phosphonates, amides, carbamates, sulfonamides, secondary amines, and N-methylamino acids.

Peptide compounds can exist in a cyclized form with an intramolecular disulfide bond between the thiol groups of the cysteines. Alternatively, an intermolecular disulfide bond between the thiol groups of the cysteines can be produced to yield a dimeric (or higher oligomeric) compound. One or more of the cysteine residues can also be substituted with a homocysteine.

I. Conjugates

A conjugate, containing: a) a single chain protease domain (or proteolytically active portion thereof) of a CVSP14 polypeptide or a full length zymogen, activated form thereof, or two or single chain protease domain thereof; and b) a targeting agent linked to the CVSP14 polypeptide directly or via a linker, wherein the agent facilitates: i) affinity isolation or purification of the conjugate; ii) attachment of the conjugate to a surface; iii) detection of the conjugate; or iv) targeted delivery to a selected tissue or cell, is provided herein. The conjugate can be a chemical conjugate or a fusion protein mixture thereof.

-103-

The targeting agent can be a protein or peptide fragment, such as a tissue specific or tumor specific monoclonal antibody or growth factor or fragment thereof linked either directly or via a linker to a CVSP14 polypeptide or a protease domain thereof. The targeting agent can also be a protein or peptide 5 fragment that contains a protein binding sequence, a nucleic acid binding sequence, a lipid binding sequence, a polysaccharide binding sequence, or a metal binding sequence, or a linker for attachment to a solid support. In a particular embodiment, the conjugate contains a) the CVSP14 or portion thereof, as described herein; and b) a targeting agent linked to the CVSP14 polypeptide 10 directly or via a linker.

Conjugates, such as fusion proteins and chemical conjugates, of the CVSP14 polypeptide with a protein or peptide fragment (or plurality thereof) that functions, for example, to facilitate affinity isolation or purification of the CVSP14 polypeptide domain, attachment of the CVSP14 polypeptide domain to 15 a surface, or detection of the CVSP14 polypeptide domain are provided. The conjugates can be produced by chemical conjugation, such as via thiol linkages, and can be produced by recombinant means as fusion proteins. In the fusion protein, the peptide or fragment thereof is linked to either the N-terminus or C-terminus of the CVSP14 polypeptide domain. In chemical conjugates the peptide 20 or fragment thereof can be linked anywhere that conjugation can be effected, and there can be a plurality of such peptides or fragments linked to a single CVSP14 polypeptide domain or to a plurality thereof.

The targeting agent is for *in vitro* or *in vivo* delivery to a cell or tissue, and includes agents such as cell or tissue-specific antibodies, growth factors and 25 other factors that bind to moieties expressed on specific cells; and other cell or tissue specific agents that promote directed delivery of a linked protein. The targeting agent can be one that specifically delivers the CVSP14 polypeptide to selected cells by interaction with a cell surface protein and internalization of conjugate or CVSP14 polypeptide portion thereof.

30 These conjugates are used in a variety of methods and are particularly suited for use in methods of activation of prodrugs, such as prodrugs that upon cleavage by the particular CVSP14, which is localized at or near the targeted cell

-104-

or tissue, protein are cytotoxic. The prodrugs are administered prior to, or simultaneously with, or subsequently to the conjugate. Upon delivery to the targeted cells, the protease activates the prodrug, which then exhibits a therapeutic effect, such as a cytotoxic effect.

5 1. Conjugation

Conjugates with linked CVSP14 polypeptide domains can be prepared either by chemical conjugation, recombinant DNA technology, or combinations of recombinant expression and chemical conjugation. The CVSP14 polypeptide domains and the targeting agent can be linked in any orientation and more than 10 one targeting agents and/or CVSP14 polypeptide domains can be present in a conjugate.

a. Fusion proteins

Fusion proteins are proved herein. A fusion protein contains: a) one or a plurality of domains of a CVSP14 polypeptides and b) a targeting agent. The 15 fusion proteins are generally produced by recombinant expression of nucleic acids that encode the fusion protein.

b. Chemical conjugation

To effect chemical conjugation herein, the CVSP14 polypeptide domain is linked via one or more selected linkers or directly to the targeting agent. 20 Chemical conjugation must be used if the targeted agent is other than a peptide or protein, such a nucleic acid or a non-peptide drug. Any means known to those of skill in the art for chemically conjugating selected moieties can be used.

2. Linkers

Linkers for two purposes are contemplated herein. The conjugates can 25 include one or more linkers between the CVSP14 polypeptide portion and the targeting agent. Additionally, linkers are used for facilitating or enhancing immobilization of a CVSP14 polypeptide or portion thereof on a solid support, such as a microtiter plate, silicon or silicon-coated chip, glass or plastic support, such as for high throughput solid phase screening protocols.

-105-

Any linker known to those of skill in the art for preparation of conjugates can be used herein. These linkers are typically used in the preparation of chemical conjugates; peptide linkers can be incorporated into fusion proteins.

Linkers can be any moiety suitable to associate a domain of CVSP14

- 5 polypeptide and a targeting agent. Such linkers and linkages include, but are not limited to, peptidic linkages, amino acid and peptide linkages, typically containing between one and about 60 amino acids, more generally between about 10 and 30 amino acids, chemical linkers, such as heterobifunctional cleavable cross-linkers, including but are not limited to, N-succinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoate, sulfosuccinimidyl (4-iodoacetyl)-aminobenzoate, 4-succinimidyl-oxycarbonyl- α -(2-pyridyl)dithio)toluene, sulfosuccinimidyl-6-[α -methyl- α -(pyridyl)dithio]-toluamido hexanoate, N-succinimidyl-3-(2-pyridyl)dithio)propionate, succinimidyl 6[3-(2-pyridyl)dithio)-propionamido] hexanoate, sulfosuccinimidyl 6[3-(2-pyridyl)dithio)-propionamido] hexanoate, 3-(2-pyridyl)dithio-propionyl hydrazide, Ellman's reagent, dichlorotriazinyl acid, and S-(2-thiopyridyl)-L-cysteine. Other linkers include, but are not limited to peptides and other moieties that reduce stearic hindrance between the domain of CVSP14 polypeptide and the targeting agent, intracellular enzyme substrates, linkers that increase the flexibility of the conjugate, linkers that increase the solubility of the conjugate, linkers that increase the serum stability of the conjugate, photocleavable linkers and acid cleavable linkers.
- 10
- 15
- 20

- 25 Other exemplary linkers and linkages that are suitable for chemically linked conjugates include, but are not limited to, disulfide bonds, thioether bonds, hindered disulfide bonds, and covalent bonds between free reactive groups, such as amine and thiol groups. These bonds are produced using heterobifunctional reagents to produce reactive thiol groups on one or both of the polypeptides and then reacting the thiol groups on one polypeptide with reactive thiol groups or amine groups to which reactive maleimido groups or thiol groups can be attached on the other. Other linkers include, acid cleavable
- 30 linkers, such as bismaleimideethoxy propane, acid labile-transferrin conjugates and adipic acid dihydrazide, that would be cleaved in more acidic intracellular compartments; cross linkers that are cleaved upon exposure to UV or visible

-106-

light and linkers, such as the various domains, such as C_H1, C_H2, and C_H3, from the constant region of human IgG₁ (see, Batra *et al.* *Molecular Immunol.*, 30:379-386 (1993)). In some embodiments, several linkers can be included in order to take advantage of desired properties of each linker.

5 Chemical linkers and peptide linkers can be inserted by covalently coupling the linker to the domain of CVSP14 polypeptide and the targeting agent. The heterobifunctional agents, described below, can be used to effect such covalent coupling. Peptide linkers can also be linked by expressing DNA encoding the linker and therapeutic agent (TA), linker and targeted agent, or
10 linker, targeted agent and therapeutic agent (TA) as a fusion protein. Flexible linkers and linkers that increase solubility of the conjugates are contemplated for use, either alone or with other linkers are also contemplated herein.

a) Acid cleavable, photocleavable and heat sensitive linkers

Acid cleavable linkers, photocleavable and heat sensitive linkers can also
15 be used, particularly where it can be necessary to cleave the domain of CVSP14 polypeptide to permit it to be more readily accessible to reaction. Acid cleavable linkers include, but are not limited to, bismaleimideethoxy propane; and adipic acid dihydrazide linkers (see, e.g., Fattom *et al.* (1992) *Infection & Immun.* 60:584-589) and acid labile transferrin conjugates that contain a sufficient
20 portion of transferrin to permit entry into the intracellular transferrin cycling pathway (see, e.g., Weihöner *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:4309-4314).

Photocleavable linkers are linkers that are cleaved upon exposure to light (see, e.g., Goldmacher *et al.* (1992) *Bioconj. Chem.* 3:104-107, which linkers are herein incorporated by reference), thereby releasing the targeted agent upon
25 exposure to light. Photocleavable linkers that are cleaved upon exposure to light are known (see, e.g., Hazum *et al.* (1981) in *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105-110, which describes the use of a nitrobenzyl group as a photocleavable protective group for cysteine; Yen *et al.* (1989) *Makromol. Chem.* 190:69-82, which describes water soluble photocleavable
30 copolymers, including hydroxypropylmethacrylamide copolymer, glycine copolymer, fluorescein copolymer and methylrhodamine copolymer; Goldmacher *et al.* (1992) *Bioconj. Chem.* 3:104-107, which describes a cross-linker

-107-

and reagent that undergoes photolytic degradation upon exposure to near UV light (350 nm); and Senter *et al.* (1985) *Photochem. Photobiol.* 42:231-237, which describes nitrobenzyloxycarbonyl chloride cross linking reagents that produce photocleavable linkages), thereby releasing the targeted agent upon 5 exposure to light. Such linkers would have particular use in treating dermatological or ophthalmic conditions that can be exposed to light using fiber optics. After administration of the conjugate, the eye or skin or other body part can be exposed to light, resulting in release of the targeted moiety from the conjugate. Such photocleavable linkers are useful in connection with diagnostic 10 protocols in which it is desirable to remove the targeting agent to permit rapid clearance from the body of the animal.

b) Other linkers for chemical conjugation

Other linkers, include trityl linkers, particularly, derivatized trityl groups to generate a genus of conjugates that provide for 15 release of therapeutic agents at various degrees of acidity or alkalinity. The flexibility thus afforded by the ability to preselect the pH range at which the therapeutic agent is released allows selection of a linker based on the known physiological differences between tissues in need of delivery of a therapeutic agent (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,612,474). For example, the 20 acidity of tumor tissues appears to be lower than that of normal tissues.

c) Peptide linkers

The linker moieties can be peptides. Peptide linkers can be employed in fusion proteins and also in chemically linked conjugates. The peptide typically has from about 2 to about 60 amino acid residues, for example from about 5 to 25 about 40, or from about 10 to about 30 amino acid residues. The length selected depends upon factors, such as the use for which the linker is included.

Peptide linkers are advantageous when the targeting agent is proteinaceous. For example, the linker moiety can be a flexible spacer amino acid sequence, such as those known in single-chain antibody research. 30 Examples of such known linker moieties include, but are not limited to, peptides, such as $(\text{Gly}_n\text{Ser})_n$ and $(\text{Ser}_m\text{Gly})_n$, in which n is 1 to 6, including 1 to

-108-

4 and 2 to 4, and m is 1 to 6, including 1 to 4, and 2 to 4, enzyme cleavable linkers and others.

Additional linking moieties are described, for example, in Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5879-5883, 1988; Whittow, M., *et al.*, *Protein Engineering* 6:989-995, 1993; Newton *et al.*, *Biochemistry* 35:545-553, 1996; A. J. Cumber *et al.*, *Bioconj. Chem.* 3:397-401, 1992; Ladurner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:330-337, 1997; and U.S. Patent. No. 4,894,443. In some embodiments, several linkers can be included in order to take advantage of desired properties of each linker.

10 **3. Targeting agents**

Any agent that facilitates detection, immobilization, or purification of the conjugate is contemplated for use herein. For chemical conjugates any moiety that has such properties is contemplated; for fusion proteins, the targeting agent is a protein, peptide or fragment thereof that is sufficient to effects the targeting 15 activity. Contemplated targeting agents include those that deliver the CVSP14 polypeptide or portion thereof to selected cells and tissues. Such agents include tumor specific monoclonal antibodies and portions thereof, growth factors, such as FGF, EGF, PDGF, VEGF, cytokines, including chemokines, and other such agents.

20 **4. Nucleic acids, plasmids and cells**

Isolated nucleic acid fragments encoding fusion proteins are provided. The nucleic acid fragment that encodes the fusion protein includes: a) nucleic acid encoding a protease domain of a CVSP14 polypeptide; and b) nucleic acid encoding a protein, peptide or effective fragment thereof that facilitates: i) 25 affinity isolation or purification of the fusion protein; ii) attachment of the fusion protein to a surface; or iii) detection of the fusion protein. Generally, the nucleic acid is DNA.

Plasmids for replication and vectors for expression that contain the above nucleic acid fragments are also provided. Cells containing the plasmids and 30 vectors are also provided. The cells can be any suitable host including, but are not limited to, bacterial cells, yeast cells, fungal cells, plant cells, insect cell and animal cells. The nucleic acids, plasmids, and cells containing the plasmids can

-109-

be prepared according to methods known in the art including any described herein.

Also provided are methods for producing the above fusion proteins. An exemplary method includes the steps of growing, i.e. culturing the cells so that 5 the proliferate, cells containing a plasmid encoding the fusion protein under conditions whereby the fusion protein is expressed by the cell, and recovering the expressed fusion protein. Methods for expressing and recovering recombinant proteins are well known in the art (*See generally, Current Protocols in Molecular Biology* (1998) § 16, John Wiley & Sons, Inc.) and such methods 10 can be used for expressing and recovering the expressed fusion proteins.

The recovered fusion proteins can be isolated or purified by methods known in the art such as centrifugation, filtration, chromatograph, electrophoresis, immunoprecipitation, etc., or by a combination thereof (*See generally, Current Protocols in Molecular Biology* (1998) § 10, John Wiley & Sons, Inc.). Generally the recovered fusion protein is isolated or purified through 15 affinity binding between the protein or peptide fragment of the fusion protein and an affinity binding moiety. As discussed in the above sections regarding the construction of the fusion proteins, any affinity binding pairs can be constructed and used in the isolation or purification of the fusion proteins. For example, the 20 affinity binding pairs can be protein binding sequences/protein, DNA binding sequences/DNA sequences, RNA binding sequences/RNA sequences, lipid binding sequences/lipid, polysaccharide binding sequences/polysaccharide, or metal binding sequences/metal.

5. Immobilization and supports or substrates therefor

25 In certain embodiments, where the targeting agents are designed for linkage to surfaces, the CVSP14 polypeptide can be attached by linkage such as ionic or covalent, non-covalent or other chemical interaction, to a surface of a support or matrix material. Immobilization can be effected directly or via a linker. The CVSP14 polypeptide can be immobilized on any suitable support, 30 including, but are not limited to, silicon chips, and other supports described herein and known to those of skill in the art. A plurality of CVSP14 polypeptide or protease domains thereof can be attached to a support, such as an array (*i.e.*,

-110-

a pattern of two or more) of conjugates on the surface of a silicon chip or other chip for use in high throughput protocols and formats.

It is also noted that the domains of the CVSP14 polypeptide can be linked directly to the surface or via a linker without a targeting agent linked thereto.

5 Hence chips containing arrays of the domains of the CVSP14 polypeptide.

The matrix material or solid supports contemplated herein are generally any of the insoluble materials known to those of skill in the art to immobilize ligands and other molecules, and are those that used in many chemical syntheses and separations. Such supports are used, for example, in affinity chromatography, in the immobilization of biologically active materials, and during chemical syntheses of biomolecules, including proteins, amino acids and other organic molecules and polymers. The preparation of and use of supports is well known to those of skill in this art; there are many such materials and preparations thereof known. For example, naturally-occurring support materials, such as agarose and cellulose, can be isolated from their respective sources, and processed according to known protocols, and synthetic materials can be prepared in accord with known protocols.

The supports are typically insoluble materials that are solid, porous, deformable, or hard, and have any required structure and geometry, including, but not limited to: beads, pellets, disks, capillaries, hollow fibers, needles, solid fibers, random shapes, thin films and membranes. Thus, the item can be fabricated from the matrix material or combined with it, such as by coating all or part of the surface or impregnating particles.

Typically, when the matrix is particulate, the particles are at least about 10-2000 μ m, but can be smaller or larger, depending upon the selected application. Selection of the matrices is governed, at least in part, by their physical and chemical properties, such as solubility, functional groups, mechanical stability, surface area swelling propensity, hydrophobic or hydrophilic properties and intended use.

-111-

If necessary, the support matrix material can be treated to contain an appropriate reactive moiety. In some cases, the support matrix material already containing the reactive moiety can be obtained commercially. The support matrix material containing the reactive moiety can thereby serve as the matrix

5 support upon which molecules are linked. Materials containing reactive surface moieties such as amino silane linkages, hydroxyl linkages or carboxysilane linkages can be produced by well established surface chemistry techniques involving silanization reactions, or the like. Examples of these materials are those having surface silicon oxide moieties, covalently linked to gamma-amino-

10 propylsilane, and other organic moieties; N-[3-(triethoxysilyl)propyl]phthalamic acid; and bis-(2-hydroxyethyl)aminopropyltriethoxysilane. Exemplary of readily available materials containing amino group reactive functionalities, include, but are not limited to, para-aminophenyltriethoxysilane. Also derivatized polystyrenes and other such polymers are well known and readily available to

15 those of skill in this art (e.g., the Tentage[®] Resins are available with a multitude of functional groups, and are sold by Rapp Polymere, Tubingen, Germany; see, U.S. Patent No. 4,908,405 and U.S. Patent No. 5,292,814; see, also Butz et al., *Peptide Res.*, 7:20-23 (1994); and Kleine et al., *Immunobiol.*, 190:53-66 (1994)).

20 These matrix materials include any material that can act as a support matrix for attachment of the molecules of interest. Such materials are known to those of skill in this art, and include those that are used as a support matrix. These materials include, but are not limited to, inorganics, natural polymers, and synthetic polymers, including, but are not limited to: cellulose, cellulose

25 derivatives, acrylic resins, glass, silica gels, polystyrene, gelatin, polyvinyl pyrrolidone, co-polymers of vinyl and acrylamide, polystyrene cross-linked with divinylbenzene and others (see, Merrifield, *Biochemistry*, 3:1385-1390 (1964)), polyacrylamides, latex gels, polystyrene, dextran, polyacrylamides, rubber, silicon, plastics, nitrocellulose, celluloses, natural sponges. Of particular interest

30 herein, are highly porous glasses (see, e.g., U.S. Patent No. 4,244,721) and others prepared by mixing a borosilicate, alcohol and water.

-112-

- Synthetic supports include, but are not limited to: acrylamides, dextran-derivatives and dextran co-polymers, agarose-polyacrylamide blends, other polymers and co-polymers with various functional groups, methacrylate derivatives and co-polymers, polystyrene and polystyrene copolymers (see, e.g., 5 Merrifield, *Biochemistry*, 3:1385-1390 (1964); Berg et al., in *Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap.*, Int. Symp., 1st, Epton, Roger (Ed), pp. 453-459 (1990); Berg et al., *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 20th, Jung, G. et al. (Eds), pp. 196-198 (1989); Berg et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8024-8026 (1989); Kent et al., *Isr. J. Chem.*, 17:243-247 (1979); Kent et 10 al., *J. Org. Chem.*, 43:2845-2852 (1978); Mitchell et al., *Tetrahedron Lett.*, 42:3795-3798 (1976); U.S. Patent No. 4,507,230; U.S. Patent No. 4,006,117; and U.S. Patent No. 5,389,449). Such materials include those made from 15 polymers and co-polymers such as polyvinylalcohols, acrylates and acrylic acids such as polyethylene-co-acrylic acid, polyethylene-co-methacrylic acid, polyethylene-co-ethylacrylate, polyethylene-co-methyl acrylate, polypropylene-co-acrylic acid, polypropylene-co-methyl-acrylic acid, polypropylene-co-ethylacrylate, polypropylene-co-methyl acrylate, polyethylene-co-vinyl acetate, polypropylene-co-vinyl acetate, and those containing acid anhydride groups such as polyethylene-co-maleic anhydride and polypropylene-co-maleic anhydride. 20 Liposomes have also been used as solid supports for affinity purifications (Powell et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 33:173 (1989)).
Numerous methods have been developed for the immobilization of 25 proteins and other biomolecules onto solid or liquid supports (see, e.g., Mosbach, *Methods in Enzymology*, 44 (1976); Weetall, *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides*, (1975); Kennedy et al., *Solid Phase Biochemistry, Analytical and Synthetic Aspects*, Scouten, ed., pp. 253-391 (1983); see, generally, *Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology*, Vol. 34, ed. W. B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. (1974); and *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, 30 *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 42, ed. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. (1974)).

-113-

Among the most commonly used methods are absorption and adsorption or covalent binding to the support, either directly or via a linker, such as the numerous disulfide linkages, thioether bonds, hindered disulfide bonds, and covalent bonds between free reactive groups, such as amine and thiol groups.

5 known to those of skill in art (see, e.g., the PIERCE CATALOG, ImmunoTechnology Catalog & Handbook, 1992-1993, which describes the preparation of and use of such reagents and provides a commercial source for such reagents; Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press (1993); see also DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**:6909 (1993); Zuckermann et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**:10646 (1992); Kurth et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**:2661 (1994); Ellman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**:4708 (1994); Sucholiki, *Tetrahedron Lett.*, **35**:7307 (1994); Su-Sun Wang, *J. Org. Chem.*, **41**:3258 (1976); Padwa et al., *J. Org. Chem.*, **41**:3550 (1971); and Vedejs et al., *J. Org. Chem.*, **49**:575 (1984), which

10 describe photosensitive linkers).

To effect immobilization, a composition containing the protein or other biomolecule is contacted with a support material such as alumina, carbon, an ion-exchange resin, cellulose, glass or a ceramic. Fluorocarbon polymers have been used as supports to which biomolecules have been attached by adsorption

20 (see, U.S. Patent No. 3,843,443; Published International PCT Application WO/86 03840).

J. **Prognosis and diagnosis**

CVSP14 polypeptide proteins, domains, analogs, and derivatives thereof, and encoding nucleic acids (and sequences complementary thereto), and anti-

25 CVSP14 polypeptide antibodies, can be used in diagnostics, particularly diagnosis of cervical cancer, colon or pancreatic cancers.

Such molecules can be used in assays, such as immunoassays, to detect, prognose, diagnose, or monitor various conditions, diseases, and disorders affecting CVSP14 polypeptide expression, or monitor the treatment thereof. For

30 purposes herein, the presence of CVSP14s in body fluids or tumor tissues are of particular interest.

-114-

In particular, such an immunoassay is carried out by a method including contacting a sample derived from a patient with an anti-CVSP14 polypeptide antibody under conditions such that specific binding can occur, and detecting or measuring the amount of any specific binding by the antibody. Such binding of antibody, in tissue sections, can be used to detect aberrant CVSP14 polypeptide localization or aberrant (e.g., increased, decreased or absent) levels of CVSP14 polypeptide. In a specific embodiment, antibody to CVSP14 polypeptide can be used to assay in a patient tissue or serum sample for the presence of CVSP14 polypeptide where an aberrant level of CVSP14 polypeptide is an indication of a 10 diseased condition.

The immunoassays which can be used include but are not limited to competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin 15 reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays and protein A immunoassays.

CVSP14 polypeptide genes and related nucleic acid sequences and subsequences, including complementary sequences, also can be used in 20 hybridization assays. CVSP14 polypeptide nucleic acid sequences, or subsequences thereof containing about at least 8 nucleotides, generally 14 or 16 or 30 or more, generally less than 1000 or up to 100, contiguous nucleotides can be used as hybridization probes. Hybridization assays can be used to detect, prognose, diagnose, or monitor conditions, disorders, or disease states 25 associated with aberrant changes in CVSP14 polypeptide expression and/or activity as described herein. In particular, such a hybridization assay is carried out by a method by contacting a sample containing nucleic acid with a nucleic acid probe capable of hybridizing to CVSP14 polypeptide encoding DNA or RNA, under conditions such that hybridization can occur, and detecting or measuring 30 any resulting hybridization.

In a specific embodiment, a method of diagnosing a disease or disorder characterized by detecting an aberrant level of a CVSP14 polypeptide in a

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-115-

subject is provided herein by measuring the level of the DNA, RNA, protein or functional activity of the CVSP14 polypeptide in a sample derived from the subject, wherein an increase or decrease in the level of the DNA, RNA, protein or functional activity of the CVSP14 polypeptide, relative to the level of the DNA,

5 RNA, protein or functional activity found in an analogous sample not having the disease or disorder indicates the presence of the disease or disorder in the subject.

Kits for diagnostic use are also provided, that contain in one or more containers an anti-CVSP14 polypeptide antibody, and, optionally, a labeled 10 binding partner to the antibody. Alternatively, the anti-CVSP14 polypeptide antibody can be labeled (with a detectable marker, e.g., a chemiluminescent, enzymatic, fluorescent, or radioactive moiety). A kit is also provided that includes in one or more containers a nucleic acid probe capable of hybridizing to SP protein-encoding RNA. In a specific embodiment, a kit can comprise in one 15 or more containers a pair of primers (e.g., each in the size range of 6-30 nucleotides) that are capable of priming amplification (e.g., by polymerase chain reaction (see e.g., Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), ligase chain reaction (see EP 320,308) use of Q β replicase, cyclic probe reaction, or other methods known in the art under appropriate reaction 20 conditions of at least a portion of an SP protein-encoding nucleic acid. A kit can optionally further comprise in a container a predetermined amount of a purified CVSP14 polypeptide or nucleic acid, e.g., for use as a standard or control.

K. **Pharmaceutical compositions and modes of administration**

1. **Components of the compositions**

25 Pharmaceutical compositions containing the identified compounds that modulate the activity of a CVSP14 polypeptide are provided herein. Also provided are combinations of a compound that modulates the activity of a CVSP14 polypeptide and another treatment or compound for treatment of a neoplastic disorder, such as a chemotherapeutic compound.

30 The CVSP14 polypeptide modulator and the anti-tumor agent can be packaged as separate compositions for administration together or sequentially or intermittently. Alternatively, they can be provided as

-116-

a single composition for administration or as two compositions for administration as a single composition. The combinations can be packaged as kits.

a. **CVSP14 polypeptide inhibitors**

- Any CVSP14 polypeptide inhibitors, including those described herein
- 5 when used alone or in combination with other compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with neoplastic diseases, including undesired and/or uncontrolled angiogenesis, can be used in the present combinations.
- 10 In one embodiment, the CVSP14 polypeptide inhibitor is an antibody or fragment thereof that specifically reacts with a CVSP14 polypeptide or the protease domain thereof, an inhibitor of the CVSP14 polypeptide production, an inhibitor of CVSP14 polypeptide membrane-localization, or any inhibitor of the expression of or, especially, the activity of a CVSP14 polypeptide.

15 b. **Anti-angiogenic agents and anti-tumor agents**

- Any anti-angiogenic agents and anti-tumor agents, including those described herein, when used alone or in combination with other compounds, that can alleviate, reduce, ameliorate, prevent, or place or maintain in a state of remission of clinical symptoms or diagnostic markers associated with undesired 20 and/or uncontrolled angiogenesis and/or tumor growth and metastasis, particularly solid neoplasms, vascular malformations and cardiovascular disorders, chronic inflammatory diseases and aberrant wound repairs, circulatory disorders, crest syndromes, dermatological disorders, or ocular disorders, can be used in the combinations. Also contemplated are anti-tumor agents for use in 25 combination with an inhibitor of a CVSP14 polypeptide.

c. **Anti-tumor agents and anti-angiogenic agents**

The compounds identified by the methods provided herein or provided herein can be used in combination with anti-tumor agents and/or anti-angiogenesis agents.

-117-

2. Formulations and route of administration

- The compounds herein and agents can be formulated as pharmaceutical compositions, typically for single dosage administration. The concentrations of the compounds in the formulations are effective for delivery of an amount, upon administration, that is effective for the intended treatment. Typically, the compositions are formulated for single dosage administration. To formulate a composition, the weight fraction of a compound or mixture thereof is dissolved, suspended, dispersed or otherwise mixed in a selected vehicle at an effective concentration such that the treated condition is relieved or ameliorated.
- 5 Pharmaceutical carriers or vehicles suitable for administration of the compounds provided herein include any such carriers known to those skilled in the art to be suitable for the particular mode of administration.
- 10 In addition, the compounds can be formulated as the sole pharmaceutically active ingredient in the composition or can be combined with other active ingredients. Liposomal suspensions, including tissue-targeted liposomes, can also be suitable as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art. For example, liposome formulations can be prepared as described in U.S. Patent No. 4,522,811.
- 15 20 The active compound is included in the pharmaceutically acceptable carrier in an amount sufficient to exert a therapeutically useful effect in the absence of undesirable side effects on the patient treated. The therapeutically effective concentration can be determined empirically by testing the compounds in known *in vitro* and *in vivo* systems, such as the assays provided herein.
- 25 The concentration of active compound in the drug composition depends on absorption, inactivation and excretion rates of the active compound, the physicochemical characteristics of the compound, the dosage schedule, and amount administered as well as other factors known to those of skill in the art.
- 30 Typically a therapeutically effective dosage is contemplated. The amounts administered can be on the order of 0.001 to 1 mg/ml, including about 0.005-0.05 mg/ml and about 0.01 mg/ml, of blood volume. Pharmaceutical dosage unit forms are prepared to provide from about 1 mg to about 1000 mg.

-118-

including from about 10 to about 500 mg, and including about 25-75 mg of the essential active ingredient or a combination of essential ingredients per dosage unit form. The precise dosage can be empirically determined.

The active ingredient can be administered at once, or can be divided into 5 a number of smaller doses to be administered at intervals of time. It is understood that the precise dosage and duration of treatment is a function of the disease being treated and can be determined empirically using known testing protocols or by extrapolation from *in vivo* or *in vitro* test data. It is to be noted that concentrations and dosage values can also vary with the severity of the 10 condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that the concentration ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the 15 scope or use of the claimed compositions and combinations containing them.

Pharmaceutically acceptable derivatives include acids, salts, esters, hydrates, solvates and prodrug forms. The derivative is typically selected such that its pharmacokinetic properties are superior to the corresponding neutral compound.

20 Thus, effective concentrations or amounts of one or more of the compounds provided herein or pharmaceutically acceptable derivatives thereof are mixed with a suitable pharmaceutical carrier or vehicle for systemic, topical or local administration to form pharmaceutical compositions. Compounds are included in an amount effective for ameliorating or treating the disorder for 25 which treatment is contemplated. The concentration of active compound in the composition depends on absorption, inactivation, excretion rates of the active compound, the dosage schedule, amount administered, particular formulation as well as other factors known to those of skill in the art.

-119-

Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, subcutaneous, or topical application can include any of the following components: a sterile diluent, such as water for injection, saline solution, fixed oil, polyethylene glycol, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvent; antimicrobial agents, such as benzyl alcohol and methyl parabens; antioxidants, such as ascorbic acid and sodium bisulfite; chelating agents, such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers, such as acetates, citrates and phosphates; and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. Parenteral preparations can be enclosed in ampules, disposable syringes or single or multiple dose vials made of glass, plastic or other suitable material.

In instances in which the compounds exhibit insufficient solubility, methods for solubilizing compounds can be used. Such methods are known to those of skill in this art, and include, but are not limited to, using cosolvents, such as dimethylsulfoxide (DMSO), using surfactants, such as Tween®, or dissolution in aqueous sodium bicarbonate. Derivatives of the compounds, such as prodrugs of the compounds can also be used in formulating effective pharmaceutical compositions. For ophthalmic indications, the compositions are formulated in an ophthalmically acceptable carrier. For the ophthalmic uses herein, local administration, either by topical administration or by injection are contemplated. Time release formulations are also desirable. Typically, the compositions are formulated for single dosage administration, so that a single dose administers an effective amount.

Upon mixing or addition of the compound with the vehicle, the resulting mixture can be a solution, suspension, emulsion or other composition. The form of the resulting mixture depends upon a number of factors, including the intended mode of administration and the solubility of the compound in the selected carrier or vehicle. If necessary, pharmaceutically acceptable salts or other derivatives of the compounds are prepared.

The compound is included in the pharmaceutically acceptable carrier in an amount sufficient to exert a therapeutically useful effect in the absence of undesirable side effects on the patient treated. It is understood that number and degree of side effects depends upon the condition for which the compounds are

-120-

administered. For example, certain toxic and undesirable side effects are tolerated when treating life-threatening illnesses that would not be tolerated when treating disorders of lesser consequence.

The compounds also can be mixed with other active materials, that do not impair the desired action, or with materials that supplement the desired action known to those of skill in the art. The formulations of the compounds and agents for use herein include those suitable for oral, rectal, topical, inhalational, buccal (e.g., sublingual), parenteral (e.g., subcutaneous, intramuscular, intradermal, or intravenous), transdermal administration or any route. The most suitable route in any given case depends on the nature and severity of the condition being treated and on the nature of the particular active compound which is being used. The formulations are provided for administration to humans and animals in unit dosage forms, such as tablets, capsules, pills, powders, granules, sterile parenteral solutions or suspensions, and oral solutions or suspensions, and oil-water emulsions containing suitable quantities of the compounds or pharmaceutically acceptable derivatives thereof. The pharmaceutically therapeutically active compounds and derivatives thereof are typically formulated and administered in unit-dosage forms or multiple-dosage forms. Unit-dose forms as used herein refers to physically discrete units suitable for human and animal subjects and packaged individually as is known in the art. Each unit-dose contains a predetermined quantity of the therapeutically active compound sufficient to produce the desired therapeutic effect, in association with the required pharmaceutical carrier, vehicle or diluent. Examples of unit-dose forms include ampoules and syringes and individually packaged tablets or capsules. Unit-dose forms can be administered in fractions or multiples thereof. A multiple-dose form is a plurality of identical unit-dosage forms packaged in a single container to be administered in segregated unit-dose form. Examples of multiple-dose forms include vials, bottles of tablets or capsules or bottles of pints or gallons. Hence, multiple dose form is a multiple of unit-doses which are not segregated in packaging.

The composition can contain along with the active ingredient: a diluent such as lactose, sucrose, dicalcium phosphate, or carboxymethylcellulose; a

-121-

- lubricant, such as magnesium stearate, calcium stearate and talc; and a binder such as starch, natural gums, such as gum acaciagelatin, glucose, molasses, polyvinylpyrrolidone, celluloses and derivatives thereof, povidone, crospovidones and other such binders known to those of skill in the art. Liquid
- 5 pharmaceutically administrable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, or otherwise mixing an active compound as defined above and optional pharmaceutical adjuvants in a carrier, such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, glycols, ethanol, and the like, to thereby form a solution or suspension. If desired, the pharmaceutical composition to be
- 10 administered can also contain minor amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting agents, emulsifying agents, or solubilizing agents, pH buffering agents and the like, for example, acetate, sodium citrate, cyclodextrine derivatives, sorbitan monolaurate, triethanolamine sodium acetate, triethanolamine olate, and other such agents. Methods of preparing such
- 15 dosage forms are known, or will be apparent, to those skilled in this art (see, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975). The composition or formulation to be administered contains a quantity of the active compound in an amount sufficient to alleviate the symptoms of the treated subject.
- 20 Dosage forms or compositions containing active ingredient in the range of 0.005% to 100% with the balance made up from non-toxic carrier can be prepared. For oral administration, the pharmaceutical compositions can take the form of, for example, tablets or capsules prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable excipients such as binding agents (e.g.,
- 25 pregelatinized maize starch, polyvinyl pyrrolidone or hydroxypropyl methylcellulose); fillers (e.g., lactose, microcrystalline cellulose or calcium hydrogen phosphate); lubricants (e.g., magnesium stearate, talc or silica); disintegrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate); or wetting agents (e.g., sodium lauryl sulphate). The tablets can be coated by methods well-
- 30 known in the art.
- The pharmaceutical preparation can also be in liquid form, for example, solutions, syrups or suspensions, or can be presented as a drug product for

-122-

reconstitution with water or other suitable vehicle before use. Such liquid preparations can be prepared by conventional means with pharmaceutically acceptable additives such as suspending agents (e.g., sorbitol syrup, cellulose derivatives or hydrogenated edible fats); emulsifying agents (e.g., lecithin or 5 acacia); non-aqueous vehicles (e.g., almond oil, oily esters, or fractionated vegetable oils); and preservatives (e.g., methyl or propyl-p-hydroxybenzoates or sorbic acid).

Formulations suitable for rectal administration can be presented as unit dose suppositories. These can be prepared by admixing the active compound 10 with one or more conventional solid carriers, for example, cocoa butter, and then shaping the resulting mixture.

Formulations suitable for topical application to the skin or to the eye generally are formulated as an ointment, cream, lotion, paste, gel, spray, aerosol and oil. Carriers which can be used include vaseline, lanoline, polyethylene 15 glycols, alcohols, and combinations of two or more thereof. The topical formulations can further advantageously contain 0.05 to 15 percent by weight of thickeners selected from among hydroxypropyl methyl cellulose, methyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, poly (alkylene glycols), poly(hydroxyalkyl), (meth)acrylates or poly(meth)acrylamides. A topical 20 formulation is often applied by instillation or as an ointment into the conjunctival sac. It also can be used for irrigation or lubrication of the eye, facial sinuses, and external auditory meatus. It can also be injected into the anterior eye chamber and other places. The topical formulations in the liquid state can be also present in a hydrophilic three-dimensional polymer matrix in the form of a 25 strip, contact lens, and the like from which the active components are released.

For administration by inhalation, the compounds for use herein can be delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other 30 suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit can be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, e.g., gelatin, for use in an inhaler or insufflator can be formulated

-123-

containing a powder mix of the compound and a suitable powder base such as lactose or starch.

Formulations suitable for buccal (sublingual) administration include, for example, lozenges containing the active compound in a flavored base, usually 5 sucrose and acacia or tragacanth; and pestiles containing the compound in an inert base such as gelatin and glycerin or sucrose and acacia.

The compounds can be formulated for parenteral administration by injection, *e.g.*, by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection can be presented in unit dosage form, *e.g.*, in ampules or in multi-dose 10 containers, with an added preservative. The compositions can be suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and can contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient can be in powder form for reconstitution with a suitable vehicle, *e.g.*, sterile pyrogen-free water or other solvents, before use.

15 Formulations suitable for transdermal administration can be presented as discrete patches adapted to remain in intimate contact with the epidermis of the recipient for a prolonged period of time. Such patches suitably contain the active compound as an optionally buffered aqueous solution of, for example, 0.1 to 0.2 M concentration with respect to the active compound. Formulations 20 suitable for transdermal administration can also be delivered by iontophoresis (*see, e.g.*, Pharmaceutical Research 3 (6), 318 (1986)) and typically take the form of an optionally buffered aqueous solution of the active compound.

The pharmaceutical compositions can also be administered by controlled release means and/or delivery devices (*see, e.g.*, in U.S. Patent Nos. 3,536,809; 25 3,598,123; 3,630,200; 3,845,770; 3,847,770; 3,916,899; 4,008,719; 4,687,610; 4,769,027; 5,059,595; 5,073,543; 5,120,548; 5,354,566; 5,591,767; 5,639,476; 5,674,533 and 5,733,566).

Desirable blood levels can be maintained by a continuous infusion of the active agent as ascertained by plasma levels. It should be noted that the 30 attending physician would know how to and when to terminate, interrupt or adjust therapy to lower dosage due to toxicity, or bone marrow, liver or kidney dysfunctions. Conversely, the attending physician would also know how to and

-124-

when to adjust treatment to higher levels if the clinical response is not adequate (precluding toxic side effects).

The efficacy and/or toxicity of the CVSP14 polypeptide inhibitor(s), alone or in combination with other agents also can be assessed by the methods known 5 in the art (See generally, O'Reilly, *Investigational New Drugs*, 15:5-13 (1997)).

The active compounds or pharmaceutically acceptable derivatives can be prepared with carriers that protect the compound against rapid elimination from the body, such as time release formulations or coatings.

Kits containing the compositions and/or the combinations with 10 instructions for administration thereof are provided. The kit can further include a needle or syringe, typically packaged in sterile form, for injecting the complex, and/or a packaged alcohol pad. Instructions are optionally included for administration of the active agent by a clinician or by the patient.

Finally, the compounds or CVSP14 polypeptides or protease domains 15 thereof or compositions containing any of the preceding agents can be packaged as articles of manufacture containing packaging material, a compound or suitable derivative thereof provided herein, which is effective for treatment of a diseases or disorders contemplated herein, within the packaging material, and a label that indicates that the compound or a suitable derivative thereof is for treating the 20 diseases or disorders contemplated herein. The label can optionally include the disorders for which the therapy is warranted.

L. Methods of treatment

The compounds identified by the methods herein are used for treating or preventing neoplastic diseases in an animal, particularly a mammal, including a 25 human, is provided herein. In one embodiment, the method includes administering to a mammal an effective amount of an inhibitor of a CVSP14 polypeptide, whereby the disease or disorder is treated or prevented.

In an embodiment, the CVSP14 polypeptide inhibitor used in the treatment or prevention is administered with a pharmaceutically acceptable 30 carrier or excipient. The mammal treated can be a human. The inhibitors provided herein are those identified by the screening assays. In addition,

-125-

antibodies and antisense nucleic acids or double-stranded RNA (dsRNA), such as RNAi, are contemplated.

The treatment or prevention method can further include administering an anti-angiogenic treatment or agent or anti-tumor agent simultaneously with, prior to or subsequent to the CVSP14 polypeptide inhibitor, which can be any compound identified that inhibits the activity of a CVSP14 polypeptide. Such compounds include small molecule modulators, an antibody or a fragment or derivative thereof containing a binding region thereof against the CVSP14 polypeptide, an antisense nucleic acid or double-stranded RNA (dsRNA), such as RNAi, encoding the CVSP14 polypeptide, and a nucleic acid containing at least a portion of a gene encoding the CVSP14 polypeptide into which a heterologous nucleotide sequence has been inserted such that the heterologous sequence inactivates the biological activity of at least a portion of the gene encoding the CVSP14 polypeptide, in which the portion of the gene encoding the CVSP14 polypeptide flanks the heterologous sequence to promote homologous recombination with a genomic gene encoding the CVSP14 polypeptide. In addition, such molecules are generally less than about 1000 nt long.

1. Antisense treatment

In a specific embodiment, as described hereinabove, CVSP14 polypeptide function is reduced or inhibited by CVSP14 polypeptide antisense nucleic acids, to treat or prevent neoplastic disease. The therapeutic or prophylactic use of nucleic acids of at least six nucleotides that are antisense to a gene or cDNA encoding CVSP14 polypeptide or a portion thereof. A CVSP14 polypeptide "antisense" nucleic acid as used herein refers to a nucleic acid capable of hybridizing to a portion of a CVSP14 polypeptide RNA (generally mRNA) by virtue of some sequence complementarity, and generally under high stringency conditions. The antisense nucleic acid can be complementary to a coding and/or noncoding region of a CVSP14 polypeptide mRNA. Such antisense nucleic acids have utility as therapeutics that reduce or inhibit CVSP14 polypeptide function, and can be used in the treatment or prevention of disorders as described *supra*.

The CVSP14 polypeptide antisense nucleic acids are of at least six nucleotides and are generally oligonucleotides (ranging from 6 to about 150

-126-

nucleotides including 6 to 50 nucleotides). The antisense molecule can be complementary to all or a portion of the protease domain. For example, the oligonucleotide is at least 10 nucleotides, at least 15 nucleotides, at least 100 nucleotides, or at least 125 nucleotides. The oligonucleotides can be DNA or 5 RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof, single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone. The oligonucleotide can include other appending groups such as peptides, or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10 86:6553-6556 (1989); Lemaire et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:648-652 (1987); PCT Publication No. WO 88/09810, published December 15, 1988) or blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. WO 89/10134, published April 25, 1988), hybridization-triggered cleavage agents (see, e.g., Krol et al., *BioTechniques* 6:958-976 (1988)) or intercalating agents (see, e.g., Zon, *Pharm. Res.* 5:539-549 (1988)).

The CVSP14 polypeptide antisense nucleic acid generally is an oligonucleotide, typically single-stranded DNA or RNA or an analog thereof or mixtures thereof. For example, the oligonucleotide includes a sequence antisense to a portion of human CVSP14 polypeptide. The oligonucleotide can 20 be modified at any position on its structure with substituents generally known in the art.

The CVSP14 polypeptide antisense oligonucleotide can include at least one modified base moiety which is selected from the group including, but not limited to 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, 25 hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 30 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v),

-127-

wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine.

5 In another embodiment, the oligonucleotide includes at least one modified sugar moiety selected from the group including but not limited to arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose. The oligonucleotide can include at least one modified phosphate backbone selected from a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, and a formacetal or analog thereof.

The oligonucleotide can be an α -anomeric oligonucleotide. An α -anomeric oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which the strands run parallel to each other (Gautier et al., *Nucl. Acids Res.* 15:6625-6641 (1987)).

The oligonucleotide can be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent and hybridization-triggered cleavage agent.

The oligonucleotides can be synthesized by standard methods known in the art, e.g. by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples, phosphorothioate oligonucleotides can be synthesized by the method of Stein et al. (*Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988)), methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451 (1988)), etc.

In a specific embodiment, the CVSP14 polypeptide antisense oligonucleotide includes catalytic RNA or a ribozyme (see, e.g., PCT International Publication WO 90/11364, published October 4, 1990; Sarver et al., *Science* 247:1222-1225 (1990)). In another embodiment, the oligonucleotide is a 2'-0-30 methylribonucleotide (Inoue et al., *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148 (1987)), or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue et al., *FEBS Lett.* 215:327-330 (1987)).

-128-

Alternatively, the oligonucleotide can be double-stranded RNA (dsRNA) such as RNAi.

In an alternative embodiment, the CVSP14 polypeptide antisense nucleic acid is produced intracellularly by transcription from an exogenous sequence.

- 5 For example, a vector can be introduced *in vivo* such that it is taken up by a cell, within which cell the vector or a portion thereof is transcribed, producing an antisense nucleic acid (RNA). Such a vector would contain a sequence encoding the CVSP14 polypeptide antisense nucleic acid. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed
- 10 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. Expression of the sequence encoding the CVSP14 polypeptide antisense RNA can be by any promoter known in the art to act in mammalian, including human, cells. Such promoters can be inducible or constitutive. Such promoters include but are not limited to: the SV40 early promoter region (Benoist and Charnbon, *Nature* 290:304-310 (1981), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto et al., *Cell* 22:787-797 (1980), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445 (1981), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al., *Nature* 296:39-42 (1982), etc.

The antisense nucleic acids include sequence complementary to at least a portion of an RNA transcript of a CVSP14 polypeptide gene, including a human CVSP14 polypeptide gene. Absolute complementarity is not required.

- 15 20 25 The amount of CVSP14 polypeptide antisense nucleic acid (dsRNA) that is effective in the treatment or prevention of neoplastic disease depends on the nature of the disease, and can be determined empirically by standard clinical techniques. Where possible, it is desirable to determine the antisense cytotoxicity in cells *in vitro*, and then in useful animal model systems prior to 30 testing and use in humans.

-129-

2. RNA interference

RNA interference (RNAi) (see, e.g. Chuang *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4985) can be employed to inhibit the expression of a gene encoding a CVSP14. Interfering RNA (RNAi) fragments, particularly double-stranded (ds) RNAi, can be used to generate loss-of-CVSP14 function. Methods relating to the use of RNAi to silence genes in organisms including, mammals, *C. elegans*, *Drosophila* and plants, and humans are known (see, e.g., Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806-811 Fire (1999) *Trends Genet.* 15:358-363; Sharp (2001) *Genes Dev.* 15:485-490; Hammond, *et al.* (2001) *Nature Rev. Genet.* 2:110-1119; Tuschi (2001) *Chem. Biochem.* 2:239-245; Hamilton *et al.* (1999) *Science* 286:950-952; Hammond *et al.* (2000) *Nature* 404:293-296; Zamore *et al.* (2000) *Cell* 101:25-33; Bernstein *et al.* (2001) *Nature* 409: 363-366; Elbashir *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:188-200; Elbashir *et al.* (2001) *Nature* 411:494-498; International PCT application No. WO 01/29058; International PCT application No. WO 99/32619). Double-stranded RNA (dsRNA)-expressing constructs are introduced into a host, such as an animal or plant using, a replicable vector that remains episomal or integrates into the genome. By selecting appropriate sequences, expression of dsRNA can interfere with accumulation of endogenous mRNA encoding a CVSP14. RNAi also can be used to inhibit expression *in vitro*. Regions include at least about 21 (or 21) nucleotides that are selective (i.e. unique) for CVSP14 are used to prepare the RNAi. Smaller fragments of about 21 nucleotides can be transformed directly into cells; larger RNAi dsRNA molecules are generally introduced using vectors that encode them. dsRNA molecules are at least about 21 bp long or longer, such as 50, 100, 150, 200 and longer.

3. Gene Therapy

In an exemplary embodiment, nucleic acids that include a sequence of nucleotides encoding a CVSP14 polypeptide or functional domains or derivative thereof, are administered to promote CVSP14 polypeptide function, by way of gene therapy. Gene therapy refers to therapy performed by the administration of a nucleic acid to a subject. In this embodiment, the nucleic acid produces its encoded protein that mediates a therapeutic effect by promoting CVSP14

-130-

polypeptide function. Any of the methods for gene therapy available in the art can be used (see, Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *An. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); and Morgan and 5 Anderson, *An. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993). For example, one therapeutic composition for gene therapy includes a CVSP14 polypeptide-encoding nucleic acid that is part of an expression vector that expresses a CVSP14 polypeptide or domain, fragment or chimeric protein thereof in a suitable host. In particular, such a nucleic acid has 10 a promoter operably linked to the CVSP14 polypeptide coding region, the promoter being inducible or constitutive, and, optionally, tissue-specific. In another particular embodiment, a nucleic acid molecule is used in which the CVSP14 polypeptide coding sequences and any other desired sequences are flanked by regions that promote homologous recombination at a desired site in 15 the genome, thus providing for intrachromosomal expression of the SP protein nucleic acid (Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989)).

Delivery of the nucleic acid into a patient can be either direct, in which case the patient is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid-carrying 20 vector, or indirect, in which case, cells are first transformed with the nucleic acid *in vitro*, then transplanted into the patient. These two approaches are known, respectively, as *in vivo* or *ex vivo* gene therapy.

In a specific embodiment, the nucleic acid is directly administered *in vivo*, where it is expressed to produce the encoded product. This can be 25 accomplished by any of numerous methods known in the art, *e.g.*, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, *e.g.*, by infection using a defective or attenuated retroviral or other viral vector (see U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection of naked DNA, or by use of microparticle 30 bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, encapsulation in liposomes, microparticles, or microcapsules, or by administering it in linkage to a peptide

-131-

which is known to enter the nucleus, by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (see e.g., Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* **262**:4429-4432 (1987)) (which can be used to target cell types specifically expressing the receptors), etc. In another embodiment, a nucleic acid-ligand complex can be formed in which the ligand is a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted *in vivo* for cell specific uptake and expression, by targeting a specific receptor (see, e.g., PCT Publications WO 92/06180 dated April 16, 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 5 dated December 23, 1992 (Wilson et al.); WO92/20316 dated November 26, 1992 (Findeis et al.); WO93/14188 dated July 22, 1993 (Clarke et al.), WO 10 93/20221 dated October 14, 1993 (Young)). Alternatively, the nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination (Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. 15 Sci. USA* **86**:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* **342**:435-438 (1989)).

In a specific embodiment, a viral vector that contains the CVSP14 polypeptide nucleic acid is used. For example, a retroviral vector can be used (see Miller et al., *Meth. Enzymol.* **217**:581-599 (1993)). These retroviral vectors have been modified to delete retroviral sequences that are not necessary for 20 packaging of the viral genome and integration into host cell DNA. The CVSP14 polypeptide nucleic acid to be used in gene therapy is cloned into the vector, which facilitates delivery of the gene into a patient. More detail about retroviral vectors can be found in Boesen et al., *Biotherapy* **5**:291-302 (1994), which describes the use of a retroviral vector to deliver the mdr1 gene to hematopoietic 25 stem cells in order to make the stem cells more resistant to chemotherapy. Other references illustrating the use of retroviral vectors in gene therapy are: Clowes et al., *J. Clin. Invest.* **93**:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* **83**:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* **4**:129-141 (1993); and Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* **3**:110-114 30 (1993).

Adenoviruses are other viral vectors that can be used in gene therapy. Adenoviruses are especially attractive vehicles for delivering genes to respiratory

-132-

epithelia. Adenoviruses naturally infect respiratory epithelia where they cause a mild disease. Other targets for adenovirus-based delivery systems are liver, the central nervous system, endothelial cells, and muscle. Adenoviruses have the advantage of being capable of infecting non-dividing cells. Kozarsky and Wilson, 5 *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) present a review of adenovirus-based gene therapy. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demonstrated the use of adenovirus vectors to transfer genes to the respiratory epithelia of rhesus monkeys. Other instances of the use of adenoviruses in gene therapy can be found in Rosenfeld et al., *Science* 252:431- 10 434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); and Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993).

Adeno-associated virus (AAV) has also been proposed for use in gene therapy (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993)).

Another approach to gene therapy involves transferring a gene to cells in 15 tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium phosphate mediated transfection, or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells are then placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells are then delivered to a patient.

20 In this embodiment, the nucleic acid is introduced into a cell prior to administration *in vivo* of the resulting recombinant cell. Such introduction can be carried out by any method known in the art, including but not limited to transfection, electroporation, microinjection, infection with a viral or bacteriophage vector containing the nucleic acid sequences, cell fusion, 25 chromosome-mediated gene transfer, microcell-mediated gene transfer, spheroplast fusion, etc. Numerous techniques are known in the art for the introduction of foreign genes into cells (see e.g., Loeffler and Behr, *Meth. Enzymol.* 217:599-618 (1993); Cohen et al., *Meth. Enzymol.* 217:618-644 (1993); Cline, *Pharmac. Ther.* 29:69-92 (1985)) and can be used, provided that 30 the necessary developmental and physiological functions of the recipient cells are not disrupted. The technique should provide for the stable transfer of the

-133-

nucleic acid to the cell, so that the nucleic acid is expressible by the cell and generally heritable and expressible by its cell progeny.

The resulting recombinant cells can be delivered to a patient by various methods known in the art. In an embodiment, epithelial cells are injected, e.g., 5 subcutaneously. In another embodiment, recombinant skin cells can be applied as a skin graft onto the patient. Recombinant blood cells (e.g., hematopoietic stem or progenitor cells) can be administered intravenously. The amount of cells envisioned for use depends on the desired effect, patient state, etc., and can be determined by one skilled in the art.

10 Cells into which a nucleic acid can be introduced for purposes of gene therapy encompass any desired, available cell type, and include but are not limited to epithelial cells, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, muscle cells, hepatocytes; blood cells such as T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, megakaryocytes, 15 granulocytes; various stem or progenitor cells, in particular hematopoietic stem or progenitor cells, e.g., such as stem cells obtained from bone marrow, umbilical cord blood, peripheral blood, fetal liver, and other sources thereof.

For example, a cell used for gene therapy is autologous to the patient. In an embodiment in which recombinant cells are used in gene therapy, a CVSP14 20 polypeptide nucleic acid is introduced into the cells such that it is expressible by the cells or their progeny, and the recombinant cells are then administered *in vivo* for therapeutic effect. In a specific embodiment, stem or progenitor cells are used. Any stem and/or progenitor cells which can be isolated and maintained *in vitro* can potentially be used in accordance with this embodiment.

25 Such stem cells include but are not limited to hematopoietic stem cells (HSC), stem cells of epithelial tissues such as the skin and the lining of the gut, embryonic heart muscle cells, liver stem cells (PCT Publication WO 94/08598, dated April 28, 1994), and neural stem cells (Stemple and Anderson, *Cell* 71:973-985 (1992)).

30 Epithelial stem cells (ESCs) or keratinocytes can be obtained from tissues such as the skin and the lining of the gut by known procedures (Rheinwald, *Meth. Cell Bio.* 21A:229 (1980)). In stratified epithelial tissue such as the skin,

-134-

renewal occurs by mitosis of stem cells within the germinal layer, the layer closest to the basal lamina. Stem cells within the lining of the gut provide for a rapid renewal rate of this tissue. ESCs or keratinocytes obtained from the skin or lining of the gut of a patient or donor can be grown in tissue culture

- 5 (Rheinwald, *Meth. Cell Bio.* 21A:229 (1980); Pittelkow and Scott, *Cancer Clinic Proc.* 61:771 (1986)). If the ESCs are provided by a donor, a method for suppression of host versus graft reactivity (e.g., irradiation, drug or antibody administration to promote moderate immunosuppression) also can be used.

With respect to hematopoietic stem cells (HSC), any technique which 10 provides for the isolation, propagation, and maintenance *in vitro* of HSC can be used in this embodiment. Techniques by which this can be accomplished include (a) the isolation and establishment of HSC cultures from bone marrow cells isolated from the future host, or a donor, or (b) the use of previously established long-term HSC cultures, which can be allogeneic or xenogeneic.

15 Non-autologous HSC generally are used with a method of suppressing transplantation immune reactions of the future host/patient. In a particular embodiment, human bone marrow cells can be obtained from the posterior iliac crest by needle aspiration (see, e.g., Kodo et al., *J. Clin. Invest.* 73:1377-1384 (1984)). For example, the HSCs can be made highly enriched or in substantially 20 pure form. This enrichment can be accomplished before, during, or after long-term culturing, and can be done by any techniques known in the art. Long-term cultures of bone marrow cells can be established and maintained by using, for example, modified Dexter cell culture techniques (Dexter et al., *J. Cell Physiol.* 91:335 (1977) or Witlock-Witte culture techniques (Witlock and Witte, *Proc.*

25 *Natl. Acad. Sci. USA* 79:3608-3612 (1982)).

In a specific embodiment, the nucleic acid to be introduced for purposes of gene therapy includes an inducible promoter operably linked to the coding region, such that expression of the nucleic acid is controllable by controlling the presence or absence of the appropriate inducer of transcription.

-135-

3. Prodrugs

A method for treating tumors is provided. The method is practiced by administering a prodrug that is cleaved at a specific site by a CVSP14 to release an active drug. Upon contact with a cell that expresses CVSP14 activity, the 5 prodrug is converted into an active drug. The prodrug can be a conjugate that contains the active agent, such as an anti-tumor drug, such as a cytotoxic agent, or other therapeutic agent (TA), linked to a substrate for the targeted CVSP14, such that the drug or agent is inactive or unable to enter a cell, in the conjugate, but is activated upon cleavage. The prodrug, for example, can 10 contain an oligopeptide, typically a relatively short, less than about 10 amino acids peptide, that is proteolytically cleaved by the targeted CVSP14. Cytotoxic agents, include, but are not limited to, alkylating agents, antiproliferative agents and tubulin binding agents. Others include, vinca drugs, mitomycins, bleomycins and taxanes.

15 M. Animal models

Transgenic animal models and animals, such as rodents, including mice 20 and rats, cows, chickens, pigs, goats, sheep, gorillas and other primates, are provided herein. In particular, transgenic non-human animals that contain heterologous nucleic acid encoding a CVSP14 polypeptide or a transgenic animal 25 in which expression of the polypeptide has been altered, such as by replacing or modifying the promoter region or other regulatory region of the endogenous gene are provided.

Such an animal can be produced by promoting recombination between an 25 exogenous CVSP14 gene that could be over-expressed or mis-expressed, such as by expression under a strong promoter, via homologous or other recombination event. For example, transgenic animals can be produced by introducing the nucleic acid using vectors or other modes of gene delivery into a germline cell, such as an embryonic stem cell. Typically the nucleic acid is introduced, such as an embryonic stem cell, which is then injected by transforming embryo- 30 derived stem (ES) cells with a vector containing the CVSP14 polypeptide-encoding nucleic acid followed by injecting the ES cells into a blastocyst, and implanting the blastocyst into a foster mother, followed by the birth of a

-136-

transgenic animal. Generally introduction into a chromosome of the animal occurs by a recombination between the heterologous CVSP14-encoding nucleic acid and endogenous nucleic acid. The heterologous nucleic acid can be targeted to a specific chromosome. In some instances, knockout animals 5 can be produced. Such an animal can be initially produced by promoting homologous recombination between a CVSP14 polypeptide gene in its chromosome and an exogenous CVSP14 polypeptide gene that has been rendered biologically inactive (typically by insertion of a heterologous sequence, e.g., an antibiotic resistance gene). In one embodiment, this homologous 10 recombination is performed by transforming embryo-derived stem (ES) cells with a vector containing the insertionally inactivated CVSP14 polypeptide gene, such that homologous recombination occurs, followed by injecting the ES cells into a blastocyst, and implanting the blastocyst into a foster mother, followed by the birth of the chimeric animal ("knockout animal") in which a CVSP14 polypeptide 15 gene has been inactivated (see Capecchi, *Science* 244:1288-1292 (1989)). The chimeric animal can be bred to produce homozygous knockout animals, which can then be used to produce additional knockout animals.

Knockout animals include, but are not limited to, mice, hamsters, sheep, pigs, cattle, and other non-human mammals. For example, a knockout mouse is 20 produced. Such knockout animals are expected to develop or be predisposed to developing neoplastic diseases and thus can have use as animal models of such diseases e.g., to screen for or test molecules for the ability to treat or prevent such diseases or disorders. Such an animal can be initially produced by promoting homologous recombination between a CVSP14 gene in its 25 chromosome and an exogenous CVSP14 polypeptide gene that would be over-expressed or mis-expressed (generally by expression under a strong promoter). In an embodiment, this homologous recombination is carried out by transforming embryo-derived stem (ES) cells with a vector containing the over-expressed or mis-expressed CVSP14 polypeptide gene, such that homologous recombination 30 occurs, followed by injecting the ES cells into a blastocyst, and implanting the blastocyst into a foster mother, followed by the birth of the chimeric animal in which a CVSP14 gene has been over-expressed or mis-expressed (see Capecchi,

-137-

Science 244:1288-1292 (1989)). The chimeric animal can be bred to produce additional animals with over-expressed or mis-expressed CVSP14 polypeptide. Such animals include, but are not limited to, mice, hamsters, sheep, pigs, cattle and other non-human mammals. In a specific embodiment, a mouse with over-expressed or mis-expressed CVSP14 polypeptide is produced.

The following examples are included for illustrative purposes only and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1

10 **Identification of CVSP14**

Preparation of Single Strand cDNA from Prostate Tumor Samples

The human prostate tumor CWR22R was grown on nude mice. CWR22R tissue was dissected and put into TRIZOL Reagent (Gibco BRL) and total RNA was purified according to the manufacturer's instructions. Poly A⁺ RNA was further purified from total RNA using Oligotex mRNA mini Kit (Qiagen). Single strand cDNA was synthesized using SuperScript First-Strand Synthesis System (Gibco BRL). Either random hexamers or oligo(dT) was used to prime the first-strand cDNA synthesis.

Serine Protease Profiling by Degenerate Primer PCR

20 Serine protease domains were amplified using degenerate primers designed from the consensus sequences flanking the catalytic histidine (DSPP1) and the catalytic serine (DSPP2). The sequence of the sense primer (DSPP1) used is as follows (SEQ ID No. 7) : 5'-TGG (GA)Tl (ACG)Tl (TA)(CG)l GCl (AG)Cl CA(TC) TG-3' (nucleotides in parentheses represent equal molar mixtures and l 25 represents deoxyinosine). The sequence of antisense primer (DSPP2) used is as follows (SEQ ID No. 8): 5'-IGG ICC ICC l(CG)(TA) (GA)TC ICC (TC)Tl (AG)CA IG(TAC) (AG)TC-3'. Random hexamer and oligo(dT) primed cDNA were used as templates for PCR reactions. PCR products were separated on agarose gels, and all products between 450- to 550-bp were extracted from the gels and 30 subcloned into the pCR2.1-TOPO cloning vector (Invitrogen). Plasmids containing PCR-generated inserts were identified by electrophoresis of EcoR I digestion products on agarose gels. Plasmids containing 450-550 bp inserts

-138-

were subjected to DNA sequencing. One of these clones contained a 474 bp insert that encoded a portion of the protease domain of a novel serine protease. This serine protease sequence is hereafter referred to as CVSP14.

Random hexamer and oligo(dT) primed cDNA were used as templates for 5 PCR reactions. PCR products were separated on agarose gels, and all products between 450- to 550-bp were extracted from the gels and subcloned into the pCR2.1-TOPO cloning vector (Invitrogen). Plasmids containing PCR-generated inserts were identified by electrophoresis of EcoR I digestion products on agarose gels. Plasmids containing 450-550 bp inserts were subjected to DNA 10 sequencing. One of these clones contained a 474 bp insert that encoded a portion of the protease domain of a serine protease, which is referred to as CVSP14 herein.

A BLAST search against the human genomic database *hg1s* (Unfinished High Throughput Genomic Sequences) revealed that this sequence matches a 15 genomic sequence AC012228 that is derived from human chromosome 11.

Cloning of cDNA Encoding the Protease Domain of CVSP14.

ClonCapture cDNA Selection Kit (Clontech) was used to obtain cDNA encoding the CVSP14 protease domain. A biotinylated 474 bp partial cDNA clone for CVSP14 was generated by PCR using DSPP1 and DSPP2 primers in the 20 presence of biotin-21-dUTP. The biotinylated product was gel purified and used as probe in RecA-mediated ClonCapture procedures. Human prostate adenocarcinoma cDNA library (Gibco BRL Cat. # 11597-010) was used as the cDNA source. The captured cDNAs were transformed into ElectroMAX DH10B cells by electroporation, and positive clones containing CVSP14 protease domain 25 were identified by colony hybridization using a non-biotinylated DSPP1 and DSPP2 PCR product. Positive clones were verified by DNA sequencing. DNA sequencing analysis of four positive clones indicated that all clones contained cDNAs encoding the protease domain of a serine protease. The cDNA encoding CVSP14 protease domain is composed of 756 bp, which translates 30 into 251-amino acids. BLAST analysis of the protein database indicated that this serine protease has highest homology to one of the serine protease domains of

-139-

Xenopus oviductin (Genbank accession number U81291 and T30338) with 47% identity.

Cloning of human CVSP14 full-length cDNA

To obtain the remaining 5' upstream cDNA of CVSP14, 5'-RACE

5 reactions were performed on the human kidney RACE cDNA synthesized using GeneRacer Kit (Ambion, Cat. No. L1500-01). GeneRacer kit is specifically designed for full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RLM-RACE). The first 5'-RACE reaction was performed by PCR using GeneRacer 5' primer with gene specific primers, GX-SP1-4AS, 5'-
10 GTTAAGCGGCCAGCCTGCAGTTGAC-3' SEQ ID NO.. The PCR products were purified from agarose gel.

A second nested PCR was then performed using GeneRacer 5' nested primer with gene specific primer GX-SP1-1AS, 5'-

15 GCTCTCCTGGGTCTGTCTGGCTTAAGTC-3' SEQ ID NO. 19 (using first 5'- RACE product as template). The PCR products from RACE reactions, which were greater than 500 bp, were purified from agarose gel and subcloned into pCR2.1-TOPO cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). Colony hybridization was then performed to identify positive colonies containing CVSP14 sequence.

An additional sequence of 279 bp was obtained from the second 5'-RACE 20 products including an ATG start codon within a sequence of AAAACTATGAGT (SEQ ID NO. 20).

Nucleotide and protein Sequence of the CVSP14

The nucleotide and Amino Acid sequences of Human CVSP14 are set forth below and in SEQ ID Nos. 12 and 13:

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

-140-

```

C G G S I V S P Q W V I T A A H C I A N
415/101 445/111
AGA AAC ATT CTG TCT ACT TTG ATT GTT ACT GCT GGA GAG TAT GAC TTA AGC CAG ACA GAC
R N I V S T L N V T A G E Y D L S Q T D
5 475/121 505/131
CCA GGA GAG CAA ACT CTC ACT ATT GAA ACT GTC ATC ATA CAT CCA CAT TTC TCC ACC AAC
P G E Q T L T I E T V I I H P H F S T K
535/141 565/151
AAA CCA ATG GAC TAT GAT ATT GCC CTT TTG GAG GCG GCT GGA GCC TTC CAA TTT GGC CAC
K P M D Y D I A L L K M A G A F Q F G C H
10 595/161 625/171
TTT GTG GGG CCC ATA TGT CTT CCA GAG CTG CGG GAG CAA TTT GAG GCT GGT TTT ATT TGT
P V G P I C L P E L R E Q F E A G F I C
15 655/181 685/191
ACA ACT GCA GGC TGG GGC CGC TTA ACT GAA GGT GGC GTC CTC TCA CAA GTC TTG CAG CAA
T T A G W G R L T E G G V L S Q V L Q E
715/201 745/211
GCG GAT CTG CCT ATT TTG ACC TTG GAA GAG TGT GTG GCA GCT CTG TTA ACA CTA AAG AGG
V N L P I L T W E B A A L L T L K R
20 775/221 805/231
CCC ATC AGT GGG AGG ACC TTT CTT CTG ACA GGT TTT CCT GAT GGG GGG AGA GAC GCA TGT
P I S G K T F L C T G F P D G G R D A C
835/241 865/251
CAG GGA GAT TCA GGA GGT TCA CTC ATG TGG CGG AAT AAG AAA GGG GCC TGG ACT CTG GCT
Q G D S G G S L M C R N K K G A W T L A
895/261 925/271
CGT CGT ACT TCC TGG GGT TTG GGC TGT GGT R A GGC TGG AGA AAC AAT GTG AGG AAA AGT
G V T S W G L G C G R G W R N N N V R K S
955/281 985/291
30 GAT CAA GGA TCC CCT GGG ATC TTC ACA GAC ATT AGT AAA GTG CTT TCC TGG ATC CAC GAA
D Q G S P G I F T D I S K V L S W I H S
1015/301 1045/311
CAC ATC CAA ACT GGT AAC TAA
H I Q T G N *

```

*Underline indicates the signal peptide

Sequence analysis and domain organization of CVSP14

The CVSP14 DNA and protein sequences were analyzed using DNA

40 Strider (version 1.2). The ORF of CVSP14 is composed of 921 bp, which translate into a 306-amino acid protein. Protein sequence analysis using the SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) program at <http://smart.embl-heidelberg.de> indicates that CVSP14 is a secreted serine protease with a signal peptide (amino acids 1-25) at the N-terminus followed by

45 a trypsin-like serine protease domain (amino acids 55-306).

The amino acid and nucleotide sequences are set forth in SEQ ID No. 12 and 13.

Gene expression profile of CVSP14 in normal and tumor tissues

To obtain information regarding the gene expression profile of the CVSP14 transcript, PCR analysis was carried out on cDNA panels made from 50 several human adult tissues (Clontech, Cat. #K1420-1), fetal tissues (Cat. #K1425-1) and primary tumors (human tumor multiple tissue cDNA panel, catalog number K1522-1, CLONTECH) using CVSP14-specific primers GX-SP1-1

-141-

(SEQ ID No. 9) (5'-GACTTAAGCCAGACAGACCCAGGAGAGC-3') and
GX-SP1-2AS
(5'-TTGTGAGAGGACGCCACCTTCAGTTAAC-3') (SEQ ID No. 10).

After 35 PCR cycles, a DNA band (246 bp) of strong intensity, indicating
5 high expression of CVSP14, was detected only in kidney cDNA. A DNA band of
moderate intensity was seen in lung cDNA, and a weak band was seen in
placenta cDNA. No detectable signal was observed in either fetal tissue or
tumor cDNA. After 40 PCR cycles, additional signals can be detected in adult
10 liver, pancreas, fetal heart, fetal lung, fetal skeletal muscle, fetal thymus, colon
adenocarcinoma (CX-1), and pancreatic adenocarcinoma (GI-103).

A PCR product of 474 bp generated by DSPP1 and DSPP2 primers was
used to probe a cDNA blot composed of cDNA synthesized from 68 human
tumors and corresponding normal tissue from the same individual (catalog
number 7840-1 human matched tumor/normal expression array; CLONTECH) as
15 well as a dot blot composed of RNA extracted from 72 different human tissues
(Human Multiple Tissue Expression (MTE) Array; Clontech, Palo Alto, CA;
catalog no. 7776-1). Strong signals, indicating high expression of CVSP14,
were detected in 6 of the 15 normal kidney cDNA samples and moderate to
weak signals could also be detected in 8 additional normal kidney cDNA
20 samples. CVSP14 signals were diminished in all the matched kidney tumor
samples. Weak signals were detected in all three pairs of prostate normal/tumor
cDNA samples. Weak signals were also detected in 3 of 9 normal breast
samples. A weak signal was also detected in one of the 7 uterine tumors, but
not in their normal tissue counterparts. Weak signals were also detected in two
25 of the three normal lung tissue samples, but not in their matched tumor samples.
Very weak signals can be seen in cDNA samples from various tumor cell lines,
including HeLa cells, Burkitt's lymphoma Daudi cells, chronic myelogenous
leukemia K562, promyelocytic leukemia HL-60 cells, melanoma G361 cells, lung
carcinoma A549 cells, lymphoblastic leukemia MOLT-4 and colorectal
30 adenocarcinoma SW480 cells.

The results of MTE analysis indicated that CVSP14 transcript is
expressed moderately in lymph node and weakly in heart, stomach, duodenum,

-142-

jejunum, ileum, iloecum, colon (ascending, transverse, and descending), kidney, skeletal muscle, lung, placenta, liver, pancreas and salivary gland.

EXAMPLE 2

Expression of the protease CVSP domains

5 Nucleic acid encoding each the CVSP14 and protease domain thereof can be cloned into a derivative of the *Pichia pastoris* vector pPIC9K (available from Invitrogen; see SEQ ID NO. 11). Plasmid pPIC9K features include the 5' AOX1 promoter fragment at 1-948; 5' AOX1 primer site at 855-875; alpha-factor secretion signal(s) at 949-1218; alpha-factor primer site at 1152-1172; multiple 10 cloning site at 1192-1241; 3' AOX1 primer site at 1327-1347; 3' AOX1 transcription termination region at 1253-1586; HIS4 ORF at 4514-1980; kanamycin resistance gene at 5743-4928; 3' AOX1 fragment at 6122-6879; ColE1 origin at 7961-7288; and the ampicillin resistance gene at 8966-8106. The plasmid is derived from pPIC9K by eliminating the Xhol site in the 15 kanamycin resistance gene and the resulting vector is herein designated pPIC9Kx.

C122S mutagenesis of the Protease domain of CVSP14

The gene encoding the protease domain of CVSP14 was mutagenized by PCR SOE (PCR-based splicing by overlap extension) to replace the unpaired 20 cysteine at position 122 (chymotrypsin numbering system; cysteine 166 in CVSP14 SEQ ID No. 13) with a serine. Two overlapping gene fragments, each containing the AGT codon for serine at position 166 were PCR amplified using the following primers: for the 5' gene fragment: TCTCTCGAGAAAAGAATTCTTGAGGAAGCCAAGTGGAG (SEQ ID No. 14) and 25 TTTGTGGGCCATAAGTCTTCCAGAGCTGCGG (SEQ ID No. 15); for the 3' gene fragment, ATTCGCAGCCGCTTAGTT-ACCAGTTGGATGTGTCGTG (SEQ ID No. 16) and CCGCAGCTCTGGAGACTTTATGGCCCCACAAA (SEQ ID No. 17). The amplified gene fragments were purified on a 1% agarose gel, mixed and reamplified by PCR to produce the full length coding sequence for 30 for the protease domain of CVSP14 C122S (Cys₁₆₆ Seq ID No 13; Cys₁₁₁, SEQ ID No. 6). This sequence was then cut with restriction enzymes NotI and Xhol, and ligated into vector pPic9KX.

-143-

Construction of CVSP14 expression vector

cDNA encoding CVSP14 containing the C122S point mutation (i.e., CVSP14C122S, position C₁₆₈ in SEQ ID Nos. 12 and 13) was cloned from pPIC9Kx:CVSP14C122S. The primers CVSP14-5'

5 GGAATTCCATATGAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAATTCTGGAG
GAAGCCAAGTGGAG (containing a NdeI restriction site; SEQ ID No. 21) and
CVSP14-3' CCGCTCGAGGTACCAAGTTGGATGTGTTCTGTGG (containing a
Xhol restriction site; SEQ ID No. 22) were used to PCR amplify the human
CVSP14 protease domain utilizing an enterokinase recognition sequence

10 (DDDDK) for zymogen activation. Amplification was conducted in a total
volume of 50µl containing 20mM tris-HCl (pH 8.75 at 25°C), 10mM KCl, 10
mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% triton X-100, 0.1mg/ml BSA, 0.2mM dNTPs,
1.0 unit ACCUZYME DNA polymerase (Bioline USA, Inc., New Jersey), and 100
pmol of primers. The reaction mixture was heated to 95°C for 5 min, followed
15 by 25 cycles of 95, 60, and 75°C for 30 s each and a final extension of 75°C
for 2 min.

PCR products were purified using a QIAquick PCR purification kit
(QIAGEN Inc., Chatsworth, CA). PCR products were doubly digested with 10
units NdeI and 10 units Xhol for 2 hrs at 37°C. The digested fragments were
20 purified on a 1.4% agarose gel and stained with ethidium bromide. The band
containing CVSP14 cDNA was excised and purified using a QIAEX II gel
extraction kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA). CVSP14 cDNA was then cloned
into the NdeI and Xhol sites of the pET21b expression vector (Novagen, Inc.,
Madison, WI) using standard methods. This vector allows the fusion of a C-
25 terminal 6xHIS tag for purification by immobilized metal affinity chromatography
(IMAC). Competent XL10 cells (Stratagene) were transformed with the
pET21bCVSP14 vector and used to produce plasmid stocks. Proper insertion
and DNA sequence were confirmed by fluorescent thermal dye DNA sequencing
methods as well as restriction digests.

-144-

Protein Expression, Purification, and Refolding

Overexpression of the gene product was achieved in *E. coli* strain BL21(DE3) containing the dnaY plasmid for rare codon optimization (Garcia *et. al.* (1986) *Cell* 45:453-459; see, U.S. Patent No. 6,270,988). 2xYT media (1L), 5 supplemented with carbenicillin (50ug/ml) and kanamycin (34ug/ml), was inoculated with a 10 ml overnight culture and grown to a density of 0.6-1.0 OD600 before induction with 1M IPTG (1mM final concentration). After 6 hours post-induction growth, cells were harvested by centrifugation (3000g x 20 minutes).

10 The cell pellet was resuspended in 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 5% LDAO, pH 7.4 (25 mL) supplemented with 5-10mg lysozyme and 1U DNaseI to lyse the cells and shear the DNA. The resulting solution was then centrifuged at 48,000g for 20 minutes. The supernatant was discarded and the inclusion body pellet was washed by homogenization with the lysis buffer followed by the lysis

15 buffer minus detergent with centrifugation as described above between washes. The inclusion body pellet was then dissolved in 25 mL 6M GuHCl, 20 mM tris-HCl, 300 mM NaCl, 20mM β Me, pH 8.0. This solution was then centrifuged at 48,000g for 30 minutes to remove particulate matter.

The resulting solution was filtered through a 0.2um syringe filter before

20 loading onto 25ml Ni-NTA resin (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA) pre-equilibrated with 6M GuHCl, 20 mM tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0. The column was washed with two column volumes equilibration buffer followed by three column volumes 8M urea, 20 mM tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0. Purified inclusion bodies are then eluted with two column volumes 8M urea, 20 mM tris-HCl, 300

25 mM NaCl, 1M imidazole, pH 8.0.

CVSP14 was refolded by slowly adding the inclusion body mixture to 8L 100mM tris-HCl, 150mM NaCl, 7.5mM cysteine, 1mM cystine, 0.5M arginine, 3g/L cholic acid, pH 8.0 using a peristaltic pump. The refolding mixture was allowed to stir at 4°C for 7 days or until thiol concentration was below 1mM as

30 detected by Ellman's reagent. The refolding solution was filtered through a 1uM filter, concentrated by ultrafiltration and the buffer exchanged in PBS, 3g/L cholic acid, pH 8.0.

-145-

Activation of CVSP14 was performed by the addition of 1-10 U/ml EKMax (Invitrogen, Carlsbad, CA) and incubation at 4°C until the reaction was deemed complete (generally 4-8 days). Residual EKMax was removed by treating the solution with a small amount of ConA resin that binds the 5 glycosylated enterokinase. Complete removal of EKMax was confirmed by measuring the activity of the solution towards a specific enterokinase fluorogenic substrate.

The resulting solution was screened for activity against a series of protease substrates: spec-tPa, spec-PL, spec-fXIIa (American Diagnostica), S-10 2239, S-2266 (Kabi Diagnostica), S-2586, S-2366, S-2444, S-2288, S-2251, S-2302, S-2765, S-2222, spec-TH (Chromogenix), and spec-fVIIa (Pentapharm). CVSP14 exhibited some activity towards a number of these substrates, but was most active towards S-2366 (DiaPharma, Westchester, OH).

EXAMPLE 3

15 Assays for identification of candidate compounds that modulate that activity of a CVSP

Assay for identifying inhibitors

The ability of test compounds to act as inhibitors of catalytic activity of a CVSP14 can be assessed in an amidolytic assay. The inhibitor-induced inhibition 20 of amidolytic activity by a recombinant CVSP or the protease domain portions thereof, can be measured by IC₅₀ values in such an assay.

The protease domain of CVSP14 expressed as described above is assayed in Costar 96 well tissue culture plates (Corning NY) for inhibition by various test compounds as follows. Approximately 1-10 nM protease is added 25 without inhibitor, or with 100000 nM inhibitor and seven 1:6 dilutions into 1X direct buffer (29.2 mM Tris, pH 8.4, 29.2 mM Imidazole, 217 mM NaCl (100 μ L final volume)), and allowed to incubate at room temperature for 30 minutes. 400 μ M substrate S 2366 (L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride; DiaPharma, Westchester, OH) is added and the reaction is 30 monitored in a SpectraMAX Plus microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA) by following change in absorbance at 405 nm for 20 minutes at 37°C.

-146-

Identification of substrates

Particular substrates for use in the assays can be identified empirically by testing substrates. The following list of substrates are exemplary of those that can be tested.

	Substrate name	Structure
5	S 2366	pyroGlu-Pro-Arg-pNA.HCl
	spectrozyme t-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA.AcOH
	N-p-tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA	N-p-tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA
	Benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA	Benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA
10	Pefachrome t-PA	CH ₃ SO ₂ -D-HHT-Gly-Arg-pNA
	S 2765	N- α -Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA.2HCl
	S 2444	pyroGlu-Gly-Arg-pNA.HCl
	S 2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl
	spectrozyme UK	Cbo-L-(γ)-Glu(α -t-BuO)-Gly-Arg-pNA.2AcOH
15	S 2302	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl
	S 2266	H-D-Val-Leu-Arg-pNA.2HCl
	S 2222	Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA.HCl R = H(50%) and R = CH ₃ (50%)
	Chromozyme PK	Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA
20	S 2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl
	S 2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA.2HCl
	Spectrozyme PI	H-D-Nle-HHT-Lys-pNA.2AcOH
		Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC
		H-Arg-Gln-Arg-Arg-AMC
25		Boc-Gln-Gly-Arg-AMC
		Z-Arg-Arg-AMC
	Spectrozyme THE	H-D-HHT-Ala-Arg-pNA.2AcOH
	Spectrozyme fXIIa	H-D-CHT-Gly-Arg-pNA.2AcOH
		CVS 2081-6 (MeSO ₂ -dPhe-Pro-Arg-pNA)
		Pefachrome fVIIa (CH ₃ SO ₂ -D-CHA-But-Arg-pNA)

30 pNA = para-nitroanilide (chromogenic)

AMC = amino methyl coumarin (fluorescent)

If none of the above substrates are cleaved, a coupled assay, described above, can be used. Briefly, test the ability of the protease to activate and enzyme, such as plasminogen and trypsinogen. To perform these assays, the 35 single chain protease is incubated with a zymogen, such as plasminogen or trypsinogen, in the presence of the a known substrate, such, lys-plasminogen,

-147-

for the zymogen. If the single chain activates the zymogen, the activated enzyme, such as plasmin and trypsin, will degrade the substrate therefor.

EXAMPLE 4

Other Assays

5 These assays are described with reference to MTSP1, but such assays can be readily adapted for use with CVSP14.

Amidolytic Assay for Determining Inhibition of Serine Protease Activity of Matriptase or MTSP1

10 The ability of test compounds to act as inhibitors of rMAP catalytic activity was assessed by determining the inhibitor-induced inhibition of amidolytic activity by the MAP, as measured by IC_{50} values. The assay buffer was HBSA (10 mM Hepes, 150mM sodium chloride, pH 7.4, 0.1% bovine serum albumin). All reagents were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

15 Two IC_{50} assays (a) one at either 30-minutes or 60-minutes (a 30-minute or a 60-minute preincubation of test compound and enzyme) and (b) one at 0-minutes (no preincubation of test compound and enzyme) were conducted. For the IC_{50} assay at either 30-minutes or 60-minutes, the following reagents were combined in appropriate wells of a Corning microtiter plate: 50 microliters

20 of HBSA, 50 microliters of the test compound, diluted (covering a broad concentration range) in HBSA (or HBSA alone for uninhibited velocity measurement), and 50 microliters of the rMAP (Corvas International) diluted in buffer, yielding a final enzyme concentration of 250 pM as determined by active site filtration. Following either a 30-minute or a 60-minute incubation at ambient

25 temperature, the assay was initiated by the addition of 50 microliters of the substrate S-2765 (N- α -Benzoyloxycarbonyl-D-arginyl-L-glycyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride; DiaPharma Group, Inc.; Franklin, OH) to each well, yielding a final assay volume of 200 microliters and a final substrate concentration of 100 μ M (about 4-times K_m). Before addition to the assay

30 mixture, S-2765 was reconstituted in deionized water and diluted in HBSA. For the IC_{50} assay at 0 minutes; the same reagents were combined: 50 microliters of HBSA, 50 microliters of the test compound, diluted (covering the identical

-148-

concentration range) in HBSA (or HBSA alone for uninhibited velocity measurement), and 50 microliters of the substrate S-2765. The assay was initiated by the addition of 50 microliters of rMAP. The final concentrations of all components were identical in both IC_{50} assays (at 30- or 60- and 0-minute).

5 The initial velocity of chromogenic substrate hydrolysis was measured in both assays by the change of absorbance at 405 nm using a Thermo Max[®] Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices) over a 5 minute period, in which less than 5% of the added substrate was used. The concentration of added inhibitor, which caused a 50% decrease in the initial rate of hydrolysis was
10 defined as the respective IC_{50} value in each of the two assays (30- or 60-minutes and 0-minute).

In vitro enzyme assays for specificity determination

The ability of compounds to act as a selective inhibitor of matriptase activity was assessed by determining the concentration of test compound that
15 inhibits the activity of matriptase by 50%, (IC_{50}) as described in the above Example, and comparing IC_{50} value for matriptase to that determined for all or some of the following serine proteases: thrombin, recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), plasmin, activated protein C, chymotrypsin, factor Xa and trypsin.

20 The buffer used for all assays was HBSA (10 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 0.1% bovine serum albumin).

The assay for IC_{50} determinations was conducted by combining in appropriate wells of a Corning microtiter plate, 50 microliters of HBSA, 50 microliters of the test compound at a specified concentration (covering a broad
25 concentration range) diluted in HBSA (or HBSA alone for V_0 (uninhibited velocity) measurement), and 50 microliters of the enzyme diluted in HBSA. Following a 30 minute incubation at ambient temperature, 50 microliters of the substrate at the concentrations specified below were added to the wells, yielding a final total volume of 200 microliters. The initial velocity of chromogenic substrate
30 hydrolysis was measured by the change in absorbance at 405 nm using a Thermo Max[®] Kinetic Microplate Reader over a 5 minute period in which less than 5% of the added substrate was used. The concentration of added inhibitor

-149-

which caused a 50% decrease in the initial rate of hydrolysis was defined as the IC₅₀ value.

Thrombin (flla) Assay

Enzyme activity was determined using the chromogenic substrate,

5 Pefachrome t-PA (CH₃SO₂-D-hexahydrotyrosine-glycyl-L-Arginine-p-nitroaniline, obtained from Pentapharm Ltd.). The substrate was reconstituted in deionized water prior to use. Purified human α -thrombin was obtained from Enzyme Research Laboratories, Inc. The buffer used for all assays was HBSA (10 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 0.1% bovine serum albumin).

10 IC₅₀ determinations were conducted where HBSA (50 μ L), α -thrombin (50 μ L) (the final enzyme concentration is 0.5 nM) and inhibitor (50 μ L) (covering a broad concentration range), were combined in appropriate wells and incubated for 30 minutes at room temperature prior to the addition of substrate Pefachrome-t-PA (50 μ L) (the final substrate concentration is 250 μ M, about 5

15 times Km). The initial velocity of Pefachrome t-PA hydrolysis was measured by the change in absorbance at 405 nm using a Thermo Max® Kinetic Microplate Reader over a 5 minute period in which less than 5% of the added substrate was used. The concentration of added inhibitor which caused a 50% decrease in the initial rate of hydrolysis was defined as the IC₅₀ value.

20 **Factor Xa**

Factor Xa catalytic activity was determined using the chromogenic substrate S-2765 (N-benzyloxycarbonyl-D-arginine-L-glycine-L-arginine-p-nitroaniline), obtained from DiaPharma Group (Franklin, OH). All substrates were reconstituted in deionized water prior to use. The final concentration of S-2765

25 was 250 μ M (about 5-times Km). Purified human Factor X was obtained from Enzyme Research Laboratories, Inc. (South Bend, IN) and Factor Xa (FXa) was activated and prepared from it as described [Bock, P.E., Craig, P.A., Olson, S.T., and Singh, P. *Arch. Biochem. Biophys.* 273:375-388 (1989)]. The enzyme was diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 0.25 nM.

30 **Recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) Assay**

rt-PA catalytic activity was determined using the substrate, Pefachrome t-PA (CH₃SO₂-D-hexahydrotyrosine-glycyl-L-arginine-p-nitroaniline, obtained from

-150-

Pentapharm Ltd.). The substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 500 micromolar (about 3-times Km). Human rt-PA (Activase[®]) was obtained from Genentech Inc. The enzyme was reconstituted in deionized water and diluted 5 into HBSA prior to the assay in which the final concentration was 1.0 nM.

Plasmin Assay

Plasmin catalytic activity was determined using the chromogenic substrate, S-2366 (L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride), which was obtained from DiaPharma group. The substrate was 10 made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 300 micromolar (about 2.5-times Km). Purified human plasmin was obtained from Enzyme Research Laboratories, Inc. The enzyme was diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 1.0 nM.

15 **Activated Protein C (aPC) Assay**

aPC catalytic activity was determined using the chromogenic substrate, Pefachrome PC (delta-carbobenzoxyl-D-lysine-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride), obtained from Pentapharm Ltd.). The substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the 20 final concentration was 400 micromolar (about 3-times Km). Purified human aPC was obtained from Hematologic Technologies, Inc. The enzyme was diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 1.0 nM.

Chymotrypsin Assay

Chymotrypsin catalytic activity was determined using the chromogenic substrate, S-2586 (methoxy-succinyl-L-arginine-L-prolyl-L-tyrosyl-p-nitroanilide), which was obtained from DiaPharma Group. The substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 100 micromolar (about 9-times Km). Purified (3X-crystallized; CDI) bovine pancreatic alpha-chymotrypsin was obtained from Worthington 25 Biochemical Corp. The enzyme was reconstituted in deionized water and diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 0.5 nM.

-151-

Trypsin Assay

Trypsin catalytic activity was determined using the chromogenic substrate, S-2222 (benzoyl-L-isoleucine-L-glutamic acid-[gamma-methyl ester]-L-arginine-p-nitroanilide), which was obtained from DiaPharma Group. The 5 substrate was made up in deionized water followed by dilution in HBSA prior to the assay in which the final concentration was 250 micromolar (about 4-times K_m). Purified (3X-crystallized; TRL3) bovine pancreatic trypsin was obtained from Worthington Biochemical Corp. The enzyme was reconstituted in deionized water and diluted into HBSA prior to assay in which the final concentration was 10 0.5 nM.

Since modifications will be apparent to those of skill in this art, it is intended that this invention be limited only by the scope of the appended claims.

-152-

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A substantially purified single chain or two chain polypeptide, comprising the protease domain of serine protease 14 (CVSP14) or a catalytically active portion thereof or a domain thereof, wherein:
 - 5 the polypeptide does not comprise the complete sequence set forth in SEQ ID No. 13; and the CVSP14 portion of the polypeptide consists essentially of the protease domain of the CVSP14 or a catalytically active portion thereof.
 - 10 2. A purified polypeptide of claim 1, comprising a sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 or a catalytically active portion thereof.
 - 15 3. A substantially purified activated two chain CVSP14 polypeptide or a catalytically active portion thereof.
 4. The substantially purified activated two chain CVSP14 polypeptide of claim 3 that comprises a polypeptide selected from the group consisting of:
 - 20 a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5 or 12; a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 6 or 13;
 - 25 a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of high stringency to the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5 or 12; a polypeptide that comprises the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 or 13;
 - 30 5. A substantially purified polypeptide that has at least 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 95% sequence identity with the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 or 13; and a polypeptide that is encoded by a sequence of nucleotides that is a splice variant of the sequence set forth in SEQ ID No. 12.

-153-

6. The polypeptide of claim 1 that consists essentially of a protease domain or a catalytically active portion thereof.

7. A substantially purified polypeptide that has at least 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 95% sequence identity with the polypeptide of claim 1 and 5 retains at least 10% of the catalytic activity on the same substrate as the polypeptide of claim 1.

8. The substantially purified polypeptide of claim 1 that is a human polypeptide.

9. The polypeptide of claim 1 that comprises the sequence of amino 10 acids set forth in SEQ ID No. 6 or a catalytically active portion thereof, or that is encoded by a sequence of nucleotides that

(a) is set forth in SEQ ID No. 5;

(b) that hybridizes under conditions of moderate or high stringency to nucleic acid complementary to an mRNA transcript present in a 15 mammalian cell that encodes a CVSP14 encoded by (a);

(c) encodes a splice variant of (a); and

(d) comprises degenerate codons of the sequences of nucleotides of (a) or (b).

10. A substantially purified single chain or two chain polypeptide of 20 claim 1 that is encoded by a sequence of nucleotides comprising a sequence of nucleotides selected from the group consisting of:

(a) a sequence of nucleotides that encodes the protease domain that comprises the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID Nos. 5 or 12;

25 (b) a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of moderate or high stringency to nucleic acid complementary to an mRNA transcript present in a mammalian cell that encodes a CVSP14 encoded by (a);

(c) a sequence of nucleotides that encodes a splice variant of (a) or (b); and

30 (d) a sequence of nucleotides that comprises degenerate codons of the sequences of nucleotides of (a) or (b).

-154-

11. A substantially pure polypeptide of claim 1, wherein the protease domain portion is encoded by a nucleic acid molecule that hybridizes under conditions of high stringency along at least about 70% of the full length to a nucleic acid molecule comprising a sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No: 5.
12. A polypeptide of claim 1, wherein the protease domain portion is encoded by a nucleic acid molecule that hybridizes under conditions of high stringency along at least 70% of its full length to a nucleic acid molecule comprising a sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No: 15 or at least one domain thereof or a catalytically active portion of the domain.
13. A polypeptide that is a mutein of the polypeptide of claim 1, wherein:
 - up to about 50% of the amino acids are replaced with another amino acid;
14. The polypeptide of claim 13, wherein up to about 10% of the amino acids are replaced with another amino acid.
15. The polypeptide of claim 13, wherein the resulting polypeptide is a single chain or two chain polypeptide that has catalytic activity of at least 10% of the unmutated polypeptide.
16. The polypeptide of claim 13, wherein a free Cysteine in the protease domain is replaced with another amino acid.
17. The polypeptide of claim 13, wherein up to about 95% of the amino acids are conserved or are replaced by conservative amino acid substitutions.
18. The polypeptide of claim 13, wherein the replacing amino acid is a serine.
19. A polypeptide that is a mutein of the polypeptide of claim 3, wherein:
 - up to about 50% of the amino acids are replaced with another amino acid;

-155-

and the resulting polypeptide is a single chain or two chain polypeptide and has catalytic activity at least 10% of the unmutated polypeptide.

20. The polypeptide of claim 19, wherein up to about 10% of the amino acids are replaced with another amino acid;

5 21. The polypeptide of claim 19, wherein the resulting polypeptide is a two-chain polypeptide and has catalytic activity at least 50% of the unmutated polypeptide.

10 22. The polypeptide of claim 19, wherein a free Cys in the protease domain is replaced with another amino acid, whereby the resulting polypeptide exhibits proteolytic activity.

23. The polypeptide of claim 22, wherein a free Cys in the protease domain is replaced with a serine.

24. A nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of any of claims 1-23.

15 25. A nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of claim 3.

26. A nucleic acid molecule, comprising a sequence of nucleotides that encodes the polypeptide of claim 6.

20 27. The polypeptide of claim 3 that consists essentially of the protease domain.

28. The nucleic acid molecule of claim 24 that comprises a sequence of nucleotides selected from the group consisting of:

(a) a sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5 or 12;

(b) a sequence of nucleotides that hybridizes under high stringency along 25 at least about 70% of its full length to the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5 or 12;

(c) degenerate codons of (a) or (b).

29. An isolated nucleic molecule that encodes a polypeptide of claim 13.

30 30. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 24.

31. The vector of claim 30 that is an expression vector.

32. The vector of claim 30 that is a eukaryotic vector.

-156-

33. The vector of claim 31 that includes a sequence of nucleotides that directs secretion of any polypeptide encoded by a sequence of nucleotides operatively linked thereto.
34. The vector of claim 30 that is a *Pichia* vector, a mammalian vector or an *E. coli* vector.
35. A cell, comprising the vector of claim 30.
36. The cell of claim 35 that is a prokaryotic cell.
37. The cell of claim 35 that is a eukaryotic cell.
38. The cell of claim 35 that is selected from among a bacterial cell, a yeast cell, a plant cell, an insect cell and an animal cell.
39. The cell of claim 35 that is a mammalian cell.
40. A nucleic acid molecule encoding a polypeptide of claim 6.
41. A vector, comprising nucleic acid molecule of claim 40.
42. A cell, comprising the vector of claim 41.
43. A recombinant non-human animal, wherein an endogenous gene that encodes a polypeptide of claim 3 has been deleted or inactivated by homologous recombination or insertional mutagenesis of the animal or an ancestor thereof.
44. A method for producing a polypeptide that contains a protease domain of a CVSP14 polypeptide, comprising:
 - culturing the cell of claim 35 under conditions whereby the encoded polypeptide is expressed by the cell; and
 - recovering the expressed polypeptide.
45. The method of claim 44, wherein the polypeptide is secreted into the culture medium.
46. The method of claim 44, wherein the polypeptide is expressed in the cytoplasm of the host cell.
47. A method for producing a polypeptide that contains a protease domain of a polypeptide, comprising:
 - culturing the cell of claim 42 under conditions whereby the encoded polypeptide is expressed by the cell; and
 - recovering the expressed polypeptide.

-157-

48. The method of claim 47, wherein the polypeptide is expressed in inclusion bodies, and the method further comprises isolating the polypeptide from the inclusion bodies under conditions, whereby the polypeptide refolds into a proteolytically active form.
- 5 49. An antisense nucleic acid molecule that comprises at least 14 contiguous nucleotides or modified nucleotides that are complementary to a contiguous sequence of nucleotides encoding the protease domain of a CVSP14 of claim 1; or
- 10 comprises at least 16 contiguous nucleotides or modified nucleotides that are complementary to a contiguous sequence of nucleotides encoding the protease domain of a CVSP14 of claim 1; or
- comprises at least 30 contiguous nucleotides or modified nucleotides that are complementary to a contiguous sequence of nucleotides encoding the protease domain of a CVSP14 of claim 1.
- 15 50. The antisense molecule of claim 49 that includes a contiguous sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5 or 12.
51. A double-stranded RNA (dsRNA) molecule that comprises at least about 21 contiguous nucleotides or modified nucleotides from the sequence of nucleotides encoding the CVSP14 of claim 1.
- 20 52. An antibody that specifically binds to the single chain form and/or two-chain form of a protease domain of the polypeptide of claim 1, or a fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof, wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody.
53. The antibody of claim 52 that inhibits the enzymatic activity of the polypeptide.
- 25 54. An antibody that specifically binds to the single chain form of a protease domain of the polypeptide of claim 1, or a fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof, wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody.
- 30 55. An antibody that specifically binds to the polypeptide of claim 3 or a fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof, wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody.

-158-

56. A conjugate, comprising:
 - a) a polypeptide of claim 1, and
 - b) a targeting agent linked to the polypeptide directly or via a linker.
57. The conjugate of claim 56, wherein the targeting agent permits
 - i) affinity isolation or purification of the conjugate;
 - ii) attachment of the conjugate to a surface;
 - iii) detection of the conjugate; or
 - iv) targeted delivery to a selected tissue or cell.
58. A conjugate, comprising:
 - a) a polypeptide of claim 3; and
 - b) a targeting agent linked to the polypeptide directly or via a linker.
59. The conjugate of claim 58, wherein the targeting agent permits
 - i) affinity isolation or purification of the conjugate;
 - ii) attachment of the conjugate to a surface;
 - iii) detection of the conjugate; or
 - iv) targeted delivery to a selected tissue or cell.
60. A conjugate, comprising:
 - a) a polypeptide of claim 6; and
 - b) a targeting agent linked to the polypeptide directly or via a linker.
61. The conjugate of claim 60, wherein the targeting agent permits
 - i) affinity isolation or purification of the conjugate;
 - ii) attachment of the conjugate to a surface;
 - iii) detection of the conjugate; or
 - iv) targeted delivery to a selected tissue or cell.
62. A combination, comprising:
 - a) an agent or treatment that inhibits the catalytic activity of the polypeptide of claim 1; and
 - b) another treatment or agent selected from anti-tumor and anti-angiogenic treatments and agents.

-159-

63. The combination of claim 62, wherein the inhibitor and the anti-tumor and/or anti-angiogenic agent are formulated in a single pharmaceutical composition or each is formulated in separate pharmaceutical compositions.
64. The combination of claim 62, wherein the inhibitor is selected from antibodies and antisense oligonucleotides and double-stranded RNA (dsRNA).
- 5 65. A solid support comprising two or more polypeptides of claim 1 linked thereto either directly or via a linker.
66. The support of claim 65, wherein the polypeptides comprise an array.
- 10 67. The support of claim 65, wherein the polypeptides comprise a plurality of different protease domains.
68. A solid support comprising two or more nucleic acid molecules of claim 24 or oligonucleotides portions thereof linked thereto either directly or via a linker, wherein the oligonucleotides contain at least 16 nucleotides.
- 15 69. The support of claim 68, wherein the nucleic acid molecules comprise an array.
70. The support of claim 68, wherein the nucleic acid molecules comprise a plurality of molecules that encode different protease domains.
71. A method for identifying compounds that modulate the protease 20 activity of a CVSP14 polypeptide, comprising:
- contacting a CVSP14 polypeptide or a catalytically active portion thereof with a substrate that is proteolytically cleaved by the polypeptide, and, either simultaneously, before or after, adding a test compound or plurality thereof;
- measuring the amount of substrate cleaved in the presence of the test 25 compound; and
- selecting compounds that change the amount of substrate cleaved compared to a control, whereby compounds that modulate the activity of the polypeptide are identified.
72. The method of claim 71, wherein the test compounds are small 30 molecules, peptides, peptidomimetics, natural products, antibodies or fragments thereof that modulate the activity of the polypeptide.

-160-

73. The method of claim 71, wherein a plurality of the test substances are screened simultaneously.

74. The method of claim 71, wherein the polypeptide consists essentially of a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides selected from 5 the group consisting of a sequence of nucleotides that:

- (a) is set forth in SEQ ID No. 5;
- (b) hybridizes under conditions of high stringency to nucleic acid complementary to an mRNA transcript present in a mammalian cell that encodes CVSP14 encoded by (a);

10 (c) encodes a splice variant of (a) or (b); and

- (d) comprises degenerate codons of the sequences of nucleotides of (a), (b) or (c).

75. The method of claim 71, wherein the polypeptide consists essentially of a polypeptide selected from the group consisting of: 15 a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5;

- a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded by the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 12;
- a polypeptide that comprises a sequence of amino acids encoded 20 by a sequence of nucleotides that hybridizes under conditions of high stringency to the sequence of nucleotides set forth in SEQ ID No. 5 or 12;
- a polypeptide that comprises the sequence of amino acids set forth as amino acids of SEQ ID No. 6;
- a polypeptide that comprises a sequence of amino acids having at 25 least about 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or 95% sequence identity with the sequence of amino acids set forth in SEQ ID No. 6 or 13; and
- a polypeptide that is encoded by a sequence of nucleotides that is a splice variant of the sequence set forth in SEQ ID No. 13.

76. The method of claim 71, wherein the change in the amount of 30 substrate cleaved is assessed by comparing the amount of substrate cleaved in the presence of the test compound with the amount of substrate cleaved in the absence of the test compound.

-161-

77. The method of claim 73, wherein a plurality of the polypeptides are linked to a solid support, either directly or via a linker.

78. The method of claim 73, wherein the polypeptides comprise an array.

5 79. A method of identifying a compound that specifically binds to a single-chain and/or two-chain protease domain and/or to single or two-chain polypeptide and/or to proteolytically active portion of the single or two chain form thereof of a CVSP14 polypeptide, comprising:

10 contacting a CVSP14 polypeptide or a proteolytically active portion thereof with a test compound or plurality thereof under conditions conducive to binding thereof; and either:

15 a) identifying test compounds that specifically bind to the single chain or two chain form of the polypeptide or to the single or to a two chain form thereof or to a proteolytically active portion of the single or two chain form thereof, or

20 b) identifying test compounds that inhibit binding of a compound known to bind a single chain or two chain form of the polypeptide or to the single or a two chain form thereof or to a proteolytically active portion of the single or two chain form thereof, wherein the known compound is contacted with the polypeptide before, simultaneously with or after the test compound.

80. The method of claim 79, wherein the polypeptide is linked either directly or indirectly via a linker to a solid support.

81. The method of claim 79, wherein the test compounds are small molecules, peptides, peptidomimetics, natural products, antibodies or fragments thereof.

82. The method of claim 79, wherein a plurality of the test substances are screened simultaneously.

83. The method of claim 79, wherein a plurality of the polypeptides are linked to a solid support.

30 84. The method of claim 79, wherein the polypeptide consists essentially of a polypeptide encoded by a sequence of nucleotides that:

(a) is set forth in SEQ ID No. 5;

-162-

- (b) hybridizes under conditions of moderate or high stringency to nucleic acid complementary to an mRNA transcript present in a mammalian cell that encodes a CVSP14 encoded by (a);
5 (c) encodes a splice variant of (a) or (b); and
(d) comprises degenerate codons of the sequences of nucleotides of (a), (b) or (c).
85. A method for identifying activators of the zymogen form of a CVSP14, comprising:
10 contacting a zymogen form of a CVSP14 polypeptide or a proteolytically active portion thereof with a substrate of the activated form of the polypeptide;
15 adding a test compound, wherein the test compound is added before, after or simultaneously with the addition of the substrate; and detecting cleavage of the substrate, thereby identifying compounds that activate the zymogen.
86. The method of claim 85, wherein the substrate is a chromogenic substrate.
87. The method of claim 86, wherein the substrate is a L-pyroglutamyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride.
- 20 88. The method of claim 85, wherein the test compound is a small molecule, a nucleic acid or a polypeptide.
89. The method of claim 85, wherein the polypeptide does not comprise the complete sequence set forth in SEQ ID No. 13; and the CVSP14 portion of the polypeptide consists essentially of the 25 protease domain of the CVSP14 or a catalytically active portion thereof.
90. A method for treating or preventing a neoplastic disease, in a mammal, comprising administering to a mammal an effective amount of an inhibitor of the proteolytic activity of a polypeptide of claim 1.
91. The method of claim 90, wherein the inhibitor is an antibody that 30 specifically binds to the polypeptide, or a fragment or derivative of the antibody containing a binding domain thereof, wherein the antibody is a polyclonal antibody or a monoclonal antibody.

-163-

92. A method for treating or preventing a neoplastic disease, in a mammal, comprising administering to a mammal an effective amount of an inhibitor of a polypeptide of claim 3.
93. A method of inhibiting tumor initiation, growth or progression or treating a malignant or pre-malignant condition, comprising administering an agent that inhibits activation of the zymogen form of a CVSP14 polypeptide or a proteolytically active portion thereof or inhibits an activity of the activated form of CVSP14 or a proteolytically active portion thereof.
94. The method of claim 93, wherein the condition is a condition of the breast, cervix, prostate, lung, ovary or colon.
95. The method of claim 93, wherein the agent is an antisense oligonucleotide, double-stranded RNA (dsRNA) or an antibody.
96. The method of claim 93, further comprising administering another treatment or agent selected from anti-tumor and anti-angiogenic treatments or agents.
97. A method of identifying a compound that binds to the single-chain or two-chain form of a CVSP14 polypeptide or to a proteolytically active portion of a single-chain or two-chain form of a CVSP14 polypeptide, comprising:
contacting a test compound with both forms;
determining to which form the compound binds; and
if it binds to a form of polypeptide, further determining whether the compound has at least one of the following properties:
(i) inhibits activation of the single-chain zymogen form of polypeptide;
(ii) inhibits activity of the two-chain or single-chain form; and
(iii) inhibits dimerization of the polypeptide.
98. A method of detecting neoplastic disease, comprising: detecting a polypeptide that comprises a polypeptide of claim 1 in a biological sample, wherein the amount detected differs from the amount of polypeptide detected from a subject who does not have neoplastic disease.
99. The method of claim 98, wherein the biological sample is selected from the group consisting of blood, urine, saliva, tears, synovial fluid, sweat,

-164-

interstitial fluid, cerebrospinal fluid, ascites fluid, tumor tissue biopsy and circulating tumor cells.

100. A method of diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, a malignancy, or other pathologic condition in a subject, comprising:

- 5 obtaining a biological sample from the subject; and
 exposing it to a detectable agent that binds to a two-chain and/or single-chain form of a CVSP14 polypeptide, wherein the pathological condition is characterized by the presence or absence of the two-chain or single-chain form.

101. A method of monitoring tumor progression and/or therapeutic effectiveness, comprising detecting and/or quantifying the level of a polypeptide of CVSP14 in a body tissue or fluid sample.

102. The method of claim 101, wherein the tumor is a tumor of the breast, cervix, prostate, lung, ovary or colon.

103. The method of claim 101, wherein the body fluid is blood, urine, sweat, saliva, cerebrospinal fluid and synovial fluid.

- 15 104. A method for identifying compounds that modulate the protease activity of a CVSP14 polypeptide, comprising:
 contacting a polypeptide of claim 1 or a proteolytically active portion thereof with a substrate that is proteolytically cleaved by the polypeptide, and,
20 either simultaneously, before or after, adding a test compound or plurality thereof;
 measuring the amount of substrate cleaved in the presence of the test compound; and
 selecting compounds that change the amount of substrate cleaved
25 compared to a control, whereby compounds that modulate the activity of the polypeptide are identified.

105. A transgenic non-human animal, comprising heterologous nucleic acid encoding a polypeptide of claim 3.

-165-

106. A polypeptide comprising a portion of a CVSP14 polypeptide, wherein the CVSP14 portion of the polypeptide consists essentially of amino acids 1-25 of SEQ ID No. 13.

107. A nucleic acid molecule encoding a polypeptide of claim 106.

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-1-

SEQUENCE LISTING

<110> Corvus International, Inc.
 Madison, Edwin
 Jiumn-Chern Yeh

<120> NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING SERINE PROTEASE CVSP14, THE ENCODED POLYPEPTIDES AND METHODS BASED THEREON

<130> 24745-1614PC

<140> Not Yet Assigned

<141> 2002-03-20

<150> 60/278,166

<151> 2001-03-22

<160> 22

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3147

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<220>

<221> CDS

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

<223> Nucleotide sequence encoding MTSP1

<300>

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

<307> -

<308> GenBank #AR081724

<309> 2000-08-31

<310> 5,972,616

<311> 1998-02-20

<312> 1999-10-26

<400> 1
 tcaagagcgg cctcggtta cc atg ggg agc gat cgg gcc cgc aag ggc gga 52
 Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly
 1 5 10

ggg ggc ccg aag gac ttc cgc ggc gga ctc aag tac aac tcc cgg cac 100
 Gly Gly Pro Lys Asp Phe Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His
 15 20 25

gag aac gtg aat ggc ttg gag gaa ggc gtc gag ttc ctg cca gtc aac 148
 Glu Lys Val Asn Gly Leu Glu Glu Val Glu Phe Leu Pro Val Asn
 30 35 40

aac gtc aag aag gtg gaa aag cat ggc ccg ggg cgc tgg stg stg ctg 196
 Asn Val Lys Lys Val Glu Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu
 45 50 55

gca gcc gtg ctg atc ggc ctc ctc ttg gtc ttg ctg ggg atc ggc ttc 244

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-2-

Ala Ala Val Leu Ile Gly Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe
 60 65 70
 ctg gtc tgg cat ttg cag tac cgg gac gtc cgt gtc cag aag gtc ttc 292
 Leu Val Trp His Leu Gln Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe
 75 80 85 90
 aat ggc tac atg agg atc aca aat gag aat ttt gtc gat gcc tac gag 340
 Asn Gly Tyr Met Arg Ile Thr Asn Glu Asn Phe Val Asp Ala Tyr Glu
 95 100 105
 aac tcc aac tcc act gag ttt gta agc ctg gcc agc aag gtc aag gac 388
 Asn Ser Asn Ser Thr Glu Phe Val Ser Leu Ala Ser Lys Val Lys Asp
 110 115 120
 gcg ctg aag ctg ctg tac agc gga gtc cca ttc ctg ggc ccc tac cac 436
 Ala Leu Lys Leu Leu Tyr Ser Gly Val Pro Phe Leu Gly Pro Tyr His
 125 130 135
 aag gag tcc gct gtg acg gcc ttc aag gag ggc agc gtc atc gcc tac 484
 Lys Glu Ser Ala Val Thr Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr
 140 145 150
 tac tgg ttg gag ttc agc atc cgg cag cac ctg gtc ggg ggg ggg 532
 Tyr Trp Ser Glu Phe Ser Ile Pro Gln His Leu Val Glu Glu Ala Glu
 155 160 165 170
 cgc gtc atg gcc gag ggc gta gtc atg ctg ccc cgg cgg cgc 580
 Arg Val Met Ala Glu Glu Arg Val Val Met Leu Pro Pro Arg Ala Arg
 175 180 185
 tcc ctg aag tcc ttt gtg gtc acc tca gtc gtc gct ttc ccc acg gac 628
 Ser Leu Lys Ser Phe Val Val Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Thr Asp
 190 195 200
 tcc aaa aca gta cag agg acc cag gag aac aac tgc aac ttt ggc ctg 676
 Ser Lys Thr Val Gln Arg Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Gly Leu
 205 210 215
 cac gcc cgc egt gtg gag ctg atg cgc ttc acc acg ccc ggc ttc cct 724
 His Ala Arg Gly Val Glu Leu Met Arg Phe Thr Thr Pro Gly Phe Pro
 220 225 230
 gac ggc ccc tac ccc gct cat gcc cgc tgc cag tgg gcc ctg cgg ggg 772
 Asp Ser Pro Tyr Pro Ala His Ala Arg Cys Gln Trp Ala Leu Arg Gly
 235 240 245 250
 gac gcc gac tca gtg ctg agc ctc acc ttc cgc aac ttt gac ctt ggc 820
 Asp Ala Asp Ser Val Leu Ser Leu Thr Phe Arg Ser Phe Asp Leu Ala
 255 260 265
 tcc tgc gac gag ccc ggc aac ctc gtc acg gtc tac aac acc ctg 868
 Ser Cys Asp Glu Arg Gly Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asn Thr Leu
 270 275 280
 agc ccc atg gag ccc cac gcc ctg gtg cag ttg tgg ggc acc tac cct 916
 Ser Pro Met Glu Pro His Ala Leu Val Gln Leu Cys Gly Thr Tyr Pro
 285 290 295

-3-

ccc tcc tac aac ctg acc ttc cac tcc tcc cag aac gtc ctg ctc atc	964
Pro Ser Tyr Asn Leu Thr Phe His Ser Ser Gln Asn Val Leu Leu Ile	
300 305 310	
aca ctg ata acc aac act gag cgg cgg cat ccc ggc ttt gag gcc acc	1012
Thr Leu Ile Thr Asn Thr Glu Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr	
315 320 325 330	
ttc ttc cag ctg cct agg atg agc agc tgc gga ggc cgc tta cgt aaa	1060
Phe Phe Gln Leu Pro Arg Met Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys	
335 340 345	
gcc cag ggg aca ttc aac agc ccc tac tac cca ggc cac tac cca ccc	1108
Ala Gln Gly Thr Phe Asn Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro	
350 355 360	
aac att gag tgc aca tgg aac att gag gtg ccc aac aac cag cat gtc	1156
Asn Ile Asp Cys Thr Trp Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val	
365 370 375	
aag stg agc ttc aaa ttc ttc tac ctg ctg gag ccc ggc gtc cct gcg	1204
Lys Val Ser Phe Lys Phe Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala	
380 385 390 390	
ggc acc tgc ccc aag gac tac stg gag atc aat ggg ggg aaa tac tgc	1252
Gly Thr Cys Pro Lys Asp Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys	
395 400 405 410	
gga gag agg tcc cag ttc gtc gtc acc agc aac agc aac aag atc aca	1300
Gly Glu Arg Ser Gln Phe Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr	
415 420 425	
gtt cgc ttc cac tca gat gag tcc tac acc gac acc ggc ttc tta gct	1348
Val Arg Phe His Ser Asp Gln Ser Tyr Asp Thr Gly Phe Leu Ala	
430 435 440	
gaa tac ctc tcc tac gag tcc agt gag cca tgc ccc ggg cag ttc acg	1396
Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr	
445 450 455	
tgc cgc acg ggg cgg tgt atc cgg aag gag ctg cgc tgc gat ggc tgg	1444
Cys Arg Thr Gly Arg Cys Ile Arg Lys Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala	
460 465 470	
gcc gac tgc acc gag cac agt gag ctc aac tgc agt tgc gac gcc	1492
Ala Asp Cys Thr Asp His Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala	
475 480 485 490	
ggc cac cag ttc acg tgc aag aac aag ttc tgc aag ccc ctc ttc tgg	1540
Gly His Gln Phe Thr Cys Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp	
495 500 505	
gtc tgc gac agt gtc aac gag tgc gga gac aac agc gac gag cag ggg	1588
Val Cys Asp Ser Val Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly	
510 515 520	
tgc agt tgt ccg gcc cag acc ttc agg tgc aat ggg aag tgc ctc	1636
Cys Ser Cys Pro Ala Gln Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu	
525 530 535	

-4-

tcg aaa aac gag gag tgc aat ggg aag gac gac tgc tgc ggg gac ggg tcc Ser Lys Ser Gln Gln Cys Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser 540 545 550	1684
gac gag gcc tcc tgc ccc aag gtc aac gtc act tgc acc aaa cac Asp Glu Ala Ser Cys Pro Lys Val Asn Val Thr Cys Thr Lys His 555 560 565 570	1732
acc tac cgc tgc ctc aat ggg ctc tgc ttg agc aag ggc aac cct gag Thr Tyr Arg Cys Leu Asn Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu 575 580 585	1780
tgt gag ggg aag gag gac tgc tgc gac ggc tca gat gag aag gag tgc Cys Asp Gly Lys Glu Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys 590 595 600	1828
gac tat ggg ctg cgg tca ttc acg aca gag gct cgt gtt ttg ggg ggc Asp Cys Gly Leu Arg Ser Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly 605 610 615	1876
acg gat gcg gat gag ggc gag tgg ccc tgg cac gta agc ctg cat gct Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala 620 625 630	1924
ctg ggc cag ggc cac atc tgc ggt gct tcc ctc atc tcc ccc aac tgg Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp 635 640 645 650	1972
ctg gtc tct gcc gca cac tgc tac atc gat gac aca gga ttc agg tac Leu Val Ser Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr 655 660 665	2020
tca gac ccc acg cag tgg acg gcc ttc ctg ggc ttg cac gac gag aac Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser 670 675 680	2068
cag cgc acg gcc cct ggg gtg cac gag cgc agg ctc aag cgc atc atc Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile 685 690 695	2116
tcc cac ccc ttc ttc aat gag ttc acc ttc gac tat gag atc ggc ctg Ser His Pro Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu 700 705 710	2164
ctg gag ctg gag aaa ccg gca gag tac agc tcc atg gtg cgg ccc atc Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile 715 720 725 730	2212
tgc ctg ccc gac gcc tcc cat gtc ttc cct gcc ggc aag gcc atc tgg Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp 735 740 745	2260
gtc acg ggc tgg gga cac acc gag tat gga ggc act ggc ggc ctg atc Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile 750 755 760	2308
ctg caa aag ggt gag atc cgc gtc atc aac gag acc acc tgg gag aac Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn	2356

WO 02/077263

PCT/US02/09939

-5-

Ile Pro Gln His Leu Val Glu Glu Ala Glu Arg Val Met Ala Glu Glu
 165 170 175
 Arg Val Val Met Leu Pro Pro Arg Ala Arg Ser Leu Lys Ser Phe Val
 180 185 190
 Val Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Thr Asp Ser Lys Thr Val Gln Arg
 195 200 205
 Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Gly Leu His Ala Arg Gly Val Glu
 210 215 220
 Leu Met Arg Phe Thr Thr Pro Gly Phe Pro Asp Ser Pro Tyr Pro Ala
 225 230 235 240
 His Ala Arg Cys Gln Trp Ala Leu Arg Gly Asp Ala Asp Ser Val Leu
 245 250 255
 Ser Leu Thr Phe Arg Ser Phe Asp Leu Ala Ser Cys Asp Glu Arg Gly
 260 265 270
 Ser Asp Leu Val Thr Val Tyr Asn Thr Leu Ser Pro Met Glu Pro His
 275 280 285
 Ala Leu Val Gln Leu Cys Gly Thr Tyr Pro Pro Ser Tyr Asn Leu Thr
 290 295 300
 Phe His Ser Ser Gln Asn Val Leu Leu Ile Thr Leu Ile Thr Asn Thr
 305 310 315 320
 Glu Arg Arg His Pro Gly Phe Glu Ala Thr Phe Phe Gln Leu Pro Arg
 325 330 335
 Met Ser Ser Cys Gly Gly Arg Leu Arg Lys Ala Gln Gly Thr Phe Asn
 340 345 350
 Ser Pro Tyr Tyr Pro Gly His Tyr Pro Pro Asn Ile Asp Cys Thr Trp
 355 360 365
 Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val Lys Val Ser Phe Lys Phe
 370 375 380
 Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala Gly Thr Cys Pro Lys Asp
 385 390 395 400
 Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe
 405 410 415
 Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr Val Arg Phe His Ser Asp
 420 425 430
 Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp
 435 440 445
 Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr Cys Arg Thr Gly Arg Cys
 450 455 460
 Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Thr Asp His
 465 470 475 480
 Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala Gly His Gln Phe Thr Cys
 485 490 495
 Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
 500 505 510
 Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gln
 515 520 525
 Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gln Gln Cys
 530 535 540
 Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
 545 550 555 560
 Lys Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His Thr Tyr Arg Cys Leu Asn
 565 570 575
 Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Glu Asp
 580 585 590
 Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser
 595 600 605
 Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly
 610 615 620
 Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gln Gly His Ile

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-7-

-8-

ccccctactac ccaggccact acccacccaa cattgactgc acatggaaca ttgagggtgcc	1140
caacaaccag catgtgaagg tgagctcaa attcctctac ctgttgagc ccgggggtgcc	1200
tgccggcacc tgccccaaagg actacgtgga gatcaatggg gagaataact gggagagag	1260
gtcccgatgttgcgttccca gcaacacgaa caadataca gtcgttcc actcagatca	1320
gtccctacacc gacaccgcgt tcttagctga ataccctcc tacgactccgttgcgttcc	1380
cccgggccat ttccacgtgcc gcacggggcg ggttatccgg aaggagctgttgcgttcc	1440
ctggccgcac tgccaccgcac acagcgatgc gtcactactgc agttgcggac ccggccacca	1500
gttccacgtgc aaggactaact tctgcacggc ctttttctgg gttctggacaa gttgtgaacga	1560
ctggcgagac aacagcgacg agcagggggtg cagttgtccg gcccaggacttcaagggttgc	1620
caatggggaaat tgccctttccaa aaaggccacca gtcgaatggg aaggacgacttgcgggggggg	1680
gtccgacgacg gcttcggccca ccaagggttgcgttgcgttccat gttccaaat acaccatccg	1740
ctggccatgttgcgttccat gggccctgtgttgcgttccat gttggccggaa aaggagacttgcgttcc	1800
tagcgtacgcg tcaatgtgaga aggactggca ctgttgccgttgcgttccat cggccatccaa gtagacagacg	1860
tcgtgttgcgttccat gttggccggaa aaggagacttgcgttccat gttggccggaa aaggagacttgcgttcc	1909
Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Glu Glu Trp Pro Trp Glu	
1 5 10 15	
gta agc ctg cat gct ctg ggc cag ggc cac atc tgc ggt gct tcc ctc	1957
Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu	
20 25 30	
atc tct ccc aac tgg ctg gtc tct gcc gca cac tgc tac atc gat gac	2005
Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp	
35 40 45	
aga gga ttc agg tac tca gac ccc acg cag tgg acg gcc ttc ctg ggc	2053
Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Ala Phe Leu Gly	
50 55 60	
ttg cac gac cag agc cag cgc acg gcc cct ggg gtg cag gag cgc agg	2101
Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Glu Glu Arg Arg	
65 70 75	
ctc aag cgc atc atc tcc cac ccc ttc ttc aat gac ttc acc ttc gag	2149
Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp	
80 85 90 95	
tat gac atc ggc ctg ctg gag ctg gag aaa ccg gca gag tac agc tcc	2197
Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser	
100 105 110	
atg gtg cgg ccc atc tgg ctg cgg gac ggc tcc cat gtc ttc cct gcc	2245
Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala	
115 120 125	
ggc aag gcc atc tgg gtc acg ggc tgg gga cac acc cag tat gga ggc	2293
Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly	
130 135 140	
act ggc ggc ctg atc ctg caa aag ggt gag atc cgc gtc atc aac cag	2341
Thr Gly Ala Leu Ile Leu Glu Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln	
145 150 155	
acc acc tgc gag aac ctc ctg cgg cag cag atc acg cgg cgc atg atg	2389
Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met	
160 165 170 175	
tgc gtg ggc ttc ctc agc ggc ggc gtg gac tcc tgc cag ggt gat tcc	2437
Cys Val Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser	

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-9-

180	185	190	
ggg gga ccc ctg tcc agc gtg gag ggc gat	ggg cgg atc ttc cag ggc	2485	
Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala	195	200	205
	200		
ggg gtg gtg agc tgg gga gac ggc tgc gct	cag agg aac aag cca ggc	2533	
Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly	210	215	220
	215		
gtg tac aca agg ctc cct ctg ttt cgg gac	tgg atc aaa gag aac act	2581	
Val Thr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr	225	230	235
	230		
ggg gta tag gggccggc cacccaaatg tgcacactg	cgggggccacc	2630	
Gly Val *	240		
catcgccac cccaggatgtgc acggctgcgag	gctggagact ggacccgtga	2690	
gccccccaaag catacatcaatc	tccggggctc caaatctcg tagaaaaatc	2750	
tcggcttcctt caggctccaaatc	aaatccatcg tagggggatc	2810	
tactggccatc actggggccaa	atgggtttaa gacacacgtt ccccccggac	2870	
ggccggaggcc ctttgcgttgc	ttatctgcctc cccctgttgc	2930	
cttcggccatc tccctcgttgc	aaaggatgttgc	2990	
ggccacgcgtt ttggaaatgc	ttatctgcctc ggacccgttgc	3050	
gaaaatgtttt taccatgtcc	aaacatgttttgc	3110	
aaaaatgtttt ttcgttgc	ttatctgcctc aatgttttgc	3174	
	aaaaatgttttgc		
<210> 4			
<211> 241			
<212> PRT			
<213> Homo Sapien			
<400> 4			
Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val	1 5 10 15		
Ser Leu His Ala Leu Gly Glu His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile	20 25 30		
Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp Arg	35 40 45		
Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Glu Arg Arg Leu	50 55 60		
His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg Leu	65 70 75 80		
Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp Tyr	85 90 95		
Asp Ile Ala Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met	100 105 110		
Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly	115 120 125		
Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr	130 135 140		
Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr	145 150 155 160		
The Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile The Pro Arg Met Met Cys	165 170 175		
Val Gly Phe Leu Ser Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly	180 185 190		
Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly			

-10-

195	200	205	
Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val			
210	215	220	
Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly			
225	230	235	240
Val			
<210> 5			
<211> 756			
<212> DNA			
<213> Homo Sapien			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)...(756)			
<223> Nucleotide sequence encoding CVSP14 protease domain			
<400> 5			
att ctt gga gga agc caa stg gag aag ggt tcc tat ccc tgg cag gta		48	
Ile Leu Gly Gly Ser Gln Val Glu Lys Gly Ser Tyr Pro Trp Gln Val			
1	5	10	15
tct ctg aaa caa agg cag aag cat att tgg gga gga aac atc gtc tca		96	
Ser Leu Lys Gln Arg Gln Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Ile Val Ser			
20	25	30	
cca cag tgg stg atc acg gcg gct cac tgc att gca aac aga aac att		144	
Pro Gln Thr Val Ile Thr Ala Ala His Cys Ile Ala Asn Arg Asn Ile			
35	40	45	
gtg tct act ttg aat gtt act gct gga gag tat gac tta agc cag aca		192	
Val Ser Thr Leu Asn Val Thr Ala Gly Glu Tyr Asp Leu Ser Gln Thr			
50	55	60	
gac cca gga gag caa act ctc act att gaa act gtc atc ata cat cca		240	
Asp Pro Gly Glu Gln Thr Leu Thr Ile Glu Thr Val Ile Ile His Pro			
65	70	75	80
cat ttc tcc acc aag aaa cca atg gac tat gat att gcc ctt ttg aag		288	
His Phe Ser Thr Lys Pro Met Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Lys			
85	90	95	
atg gct gga gcc ttc caa ttt ggc cac ttt gtg ggg ccc ata tgt ctt		336	
Met Ala Gly Ala Phe Gln Phe Gly His Phe Val Gly Pro Ile Cys Leu			
100	105	110	
cca gag ctg cgg gag caa ttt gag gct ggt ttt att tgt aca act gca		384	
Pro Glu Leu Arg Glu Gln Phe Glu Ala Gly Phe Ile Cys Thr Thr Ala			
115	120	125	
ggc tgg ggc cgc tta act gaa ggt ggc gtc ctc tca caa gtc ttg cag		432	
Gly Trp Gly Arg Leu Thr Glu Gly Val Leu Ser Gln Val Leu Gln			
130	135	140	
gaa gtg aat ctg cct att ttg acc ttg gaa gag tgt gtg gca gct ctg		480	
Glu Val Asn Leu Pro Ile Leu Thr Trp Glu Glu Cys Val Ala Ala Leu			
145	150	155	160

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-11-

tta aca cta aag agg ccc atc agt	ggg aag acc ttt ctt tgc aca ggt	528
Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ile Ser	Gly Lys Thr Phe Leu Cys Thr Gly	
185	176 175	
ttt cct gat gga ggg aga gac gca	tgt cag gga gat tca gga ggt tca	576
Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala	Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ser	
180	185 190	
ctc atg tgc cgg aat aac aaa ggg	gcc tgg act ctg gct ggt gtg act	624
Leu Met Cys Arg Asn Lys Lys Gly	Ala Trp Thr Leu Ala Gly Val Thr	
195	200 205	
tcc tgg ggt ttg ggc tgg ggt cga	ggc tgg aga aac aat gtg agg aaa	672
Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg Gly	Trp Arg Asn Asn Val Arg Lys	
210	215 220	
agt gat caa gga tcc cct ggg atc	tcc aca gac att aat aaa gtg ctt	720
Ser Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile	Phe Thr Asp Ile Ser Lys Val Leu	
225	230 235	
tcc tgg atc cac gaa cac atc caa	act ggt aac taa	756
Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln	Thr Gly Asn *	
245	250	
<210> 6		
<211> 251		
<212> PRT		
<213> Homo Sapien		
<400> 6		
Ile Leu Gly Gly Ser Gln Val Glu Lys	Gly Ser Tyr Pro Trp Gln Val	
1 5	10 15	
Ser Leu Lys Gin Arg Gln Lys His Ile	Cys Gly Gly Ser Ile Val Ser	
20 25	30	
Pro Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His	Cys Ile Ala Asn Arg Asn Ile	
35 40	45	
Val Ser Thr Leu Asn Val Thr Ala	Gly Tyr Asp Leu Ser Gln Thr	
50 55	60	
Asp Pro Gly Glu Gln Thr Leu Thr Ile	Glu Thr Val Ile Ile His Pro	
65 70	75 80	
His Phe Ser Thr Lys Pro Met Asp Tyr	Asp Ile Ala Leu Leu Lys	
85 90	95	
Met Ala Gly Ala Phe Gln Phe Gly	His Phe Val Gly Pro Ile Cys Leu	
100 105	110	
Pro Glu Leu Arg Glu Gln Phe Glu	Ala Gly Phe Ile Cys Thr Thr Ala	
115 120	125	
Gly Trp Gly Arg Leu Thr Glu	Gly Gly Val Leu Ser Gln Val Leu Gln	
130 135	140	
Glu Val Asn Leu Pro Ile Leu Thr	Trp Glu Glu Cys Val Ala Ala Leu	
145 150	155 160	
Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ile Ser	Gly Lys Thr Phe Leu Cys Thr Gly	
165 170	175	
Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala	Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Ser	
180 185	190	
Leu Met Cys Arg Asn Lys Lys Gly	Ala Trp Thr Leu Ala Gly Val Thr	
195 200	205	
Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg	Gly Trp Arg Asn Asn Val Arg Lys	

WO 02/077263

PCT/US02/09939

-12-

```

210 215 220
Sex Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile Phe Thr Asp Ile Ser Lys Val Leu
225 230 235 240
Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln Thr Gly Asn
245 250

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sense primer: DSSP11

<221> modified_base
<222> 7, 12, 17, 20, 24
<223> N is Deoxyinosine

<400> 7
tgggatnacg tntacgngcn gcgnccatctg 30

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense primer: DSSP2

<221> modified_base
<222> 1, 4, 7, 10, 19, 25, 30
<223> N is Deoxyinosine

<400> 8
nggnccnccn cgttagatcnc ctctnagcan gtac 34

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CVSP14 specific primer: GX-SP1-1

<400> 9
gacttaagcc agacagaccc aggagagc 28

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CVSP14 specific primer: GX-SP1-1-2AS

<400> 10
ttgtgagagg agcccacctt cagttaagc 29

<210> 11

```

-13-

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-14-

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-15-

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-16-

-17-

acc ttt ctt tgc aca ggt ttt cct gat gga ggg aga gac gca tgt cag 837
 Thr Phe Leu Cys Thr Gly Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala Cys Gln
 230 235 240
 gga gat tca gga ggt tca ctc atg tgc cgg aat aag aaa ggg gcc tgg 885
 Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu Met Cys Arg Asn Lys Lys Gly Ala Trp
 245 250 255
 act ctg cgt cgt ctg act tcc tgg ggt ttg ggc tgg tgg cgt cgg ccc tgg 933
 Thr Leu Ala Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg Gly Trp
 260 265 270
 aga aac aat gtg agg aaa agt gat caa gga tcc cct ggg atc ttc aca 981
 Arg Asn Asn Val Arg Lys Ser Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile Phe Thr
 275 280 285
 gac att att aaa gtg ctt tcc tgg atc cac gaa cac att caa act ggt 1029
 Asp Ile Ser Lys Val Leu Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln Thr Gly
 290 295 300 305
 aac taa 1035
 Asn *

<210> 13
 <211> 306
 <212> PPT
 <213> Homo Sapien

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1) ... (25)
 <223> signal peptide

<400> 13
 Met Ser Leu Lys Met Leu Ile Ser Arg Asn Lys Leu Ile Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Ile Val Phe Phe Glu Gln Gly Lys Ser Ala Ala Leu Ser Leu Pro
 20 25 30
 Lys Ala Pro Ser Cys Gly Gln Ser Leu Val Lys Val Gln Pro Trp Asn
 35 40 45
 Tyr Phe Asn Ile Phe Ser Arg Ile Leu Gly Gly Ser Gln Val Glu Lys
 50 55 60
 Gly Ser Tyr Pro Trp Gln Val Ser Leu Lys Gln Arg Gln Lys His Ile
 65 70 75 80
 Cys Gly Gly Ser Ile Val Ser Pro Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His
 85 90 95
 Cys Ile Ala Asn Arg Asn Ile Val Ser Thr Leu Asn Val Thr Ala Gly
 100 105 110
 Glu Tyr Asp Leu Ser Gln Thr Asp Pro Gly Glu Thr Leu Thr Ile
 115 120 125
 Glu Thr Val Ile Ile His Pro His Phe Ser Thr Lys Lys Pro Met Asp
 130 135 140
 Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Lys Met Ala Gly Ala Phe Gln Phe Gly His
 145 150 155 160
 Phe Val Gly Pro Ile Cys Leu Pro Glu Leu Arg Gln Gln Phe Glu Ala
 165 170 175
 Gly Phe Ile Cys Thr Thr Ala Gly Trp Gly Arg Leu Thr Glu Gly Gly

WO 02/077263

PCT/US02/09039

- 18 -

```

180          185          190
Val Leu Ser Gln Val Leu Gln Glu Val Asn Leu Pro Ile Leu Thr Trp
195          200          205
Glu Glu Cys Val Ala Leu Ala Leu Thr Leu Lys Arg Pro Ile Ser Gly
210          215          220
Lys Thr Phe Leu Cys Thr Gly Phe Pro Asp Gly Gly Arg Asp Ala Cys
225          230          235          240
Gly Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu Met Cys Arg Asn Lys Gly Ala
245          250          255
Trp Thr Leu Ala Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Arg Gly
260          265          270
Trp Arg Asn Asn Val Arg Lys Ser Asp Gln Gly Ser Pro Gly Ile Phe
275          280          285
Thr Asp Ile Ser Lys Val Leu Ser Trp Ile His Glu His Ile Gln Thr
290          295          300
Gly Asn
305

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
tcttcgaga aaaaattct tggaggaagc caagtggag
39

<210> 15
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
tttgtggggc ccataagtct tccagagctg cgg
33

<210> 16
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
attccgcggcc gcttagttac cagtttgat gtgttcgtg
39

<210> 17
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

```

WO 02/077263

PCT/US02/09039

-19-

<400> 17
ccgcagctct ggaagactta tggggccccac aaa 33
<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 18
gttaagccgc cccagcctgc agttgtac 28
<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer
<400> 19
gctttccctgg gtctgtctgg cttaagt 27
<210> 20
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> start site
<400> 20
aaaaactatgaa gt 12
<210> 21
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CVSP14 specific primer
<400> 21
ggaaattccat atgagcagcg gccatatcg a gacgacgac aaaattctt g g g a a g c c a 60
a g t g g a g 67
<210> 22
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CVSP14 specific primer
<400> 22
ccgcctcgagg ttaccatgg ggatgtttt g t g g 34

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077263 A3(51) International Patent Classification: C12N 9/64,
15/57, 15/63, 15/70, 15/74, 15/79, 15/80, 15/85, C12Q
1/37European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA1 patent
(BT, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number: PCT/US02/09039

(22) International Filing Date: 20 March 2002 (20.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/278,166 22 March 2001 (22.03.2001) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/278,166 (CIP)
Filed on 22 March 2001 (22.03.2001)(71) Applicant (for all designated States except US): CORVAS
INTERNATIONAL, INC. [US/US], 3030 Science Park
Road, San Diego, CA 92121 (US).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MADISON, Edwin,
L. [US/US]; 11005 Cedarcrest Way, San Diego, CA 92121
(US); YEH, Juiunn-Chern [/US]; 11629 Wetsview
Way, San Diego, CA 92126 (US).(74) Agents: SEIDMAN, Stéphanie, L., et al.; Heller Uhrman
White & McAuliffe LLP, 4350 La Jolla Village Drive, San
Diego, CA 92122-1246 (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, GI, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, L, C,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PII, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TI, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.Declarations under Rule 4.17:
as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(a)) for the following designations: 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, L, C, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MA, MZ, NO, NZ, OM, PII, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, 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, SE, TR), OA1 patent (BT, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(a)) for the following designations: 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, L, C, LK, LR, LS, LT, LU, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MA, MZ, NO, NZ, OM, PII,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent
(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, SE, TR), OA1 patent (BT, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)(82) Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
25 September 2003

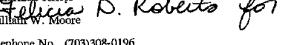
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES ENCODING SERINE PROTEASE CVSP14, THE ENCODED POLYPEPTIDES AND
METHODS BASED THEREON(57) Abstract: Provided herein are polypeptides designated CVSP14 polypeptides that exhibit protease activity as a single chain or
as an activated two chain form. Methods using the polypeptides to identify compounds that modulate the protease activity thereof
are provided. The polypeptides also serve as tumor markers.

WO 02/077263 A3

A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09039															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 9/64, 15/57, 15/63, 15/70, 15/74, 15/79, 15/80, 15/85; C12Q 1/37 US CL : 435/226, 23, 69.1, 252.3, 320.1; 536/32.2, 24.31 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/226, 23, 69.1, 252.3, 320.1; 536/32.2, 24.31																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; width: 10%;">Category *</th> <th style="text-align: left; width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; width: 30%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X,P — Y,P</td> <td>WO 01/46407, A1 (LEXICON GENETICS INCORPORATED) 28 June 2002 (28.06.2001), SEQ IDs NOS:1-4, pages 2-8 and 10-21, and claims 1-3.</td> <td>1-15, 17, 19-21, 24-42, 44-47, 56-61, 68 & 69. — 48, 65-67, 70-78 & 104.</td> </tr> <tr> <td>X,P — Y,P</td> <td>WO 01/98468 A2 (CYCTE GENOMICS INC.) 27 December 2001 (27.12.2001), SEQ IDs NOS:20 & 41, and pages 9-43, 64, 67, 69-81, 84-86, 89, 103 & 114, see particularly pages 19, 89, 103 & 114.</td> <td>1-15, 17, 19-22, 24-42, 44-48, 56-61, 68, 69, 71-76 & 104. — 15, 18, 23, 65-67, 70, 77 & 78.</td> </tr> <tr> <td>Y,P</td> <td>WO 01/27642 A2 (SUPERARRAY, INC.) 19 April 2001 (19.04.2001), pages 9-54.</td> <td>65-68, 77 & 78.</td> </tr> <tr> <td>Y,P</td> <td>US 2002/0019046 A1 (YUAN et al) 14 February 2002 (14.02.2002), paragraphs 0009-0024 & 0033-0060 and Figures 1-3.</td> <td>70.</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X,P — Y,P	WO 01/46407, A1 (LEXICON GENETICS INCORPORATED) 28 June 2002 (28.06.2001), SEQ IDs NOS:1-4, pages 2-8 and 10-21, and claims 1-3.	1-15, 17, 19-21, 24-42, 44-47, 56-61, 68 & 69. — 48, 65-67, 70-78 & 104.	X,P — Y,P	WO 01/98468 A2 (CYCTE GENOMICS INC.) 27 December 2001 (27.12.2001), SEQ IDs NOS:20 & 41, and pages 9-43, 64, 67, 69-81, 84-86, 89, 103 & 114, see particularly pages 19, 89, 103 & 114.	1-15, 17, 19-22, 24-42, 44-48, 56-61, 68, 69, 71-76 & 104. — 15, 18, 23, 65-67, 70, 77 & 78.	Y,P	WO 01/27642 A2 (SUPERARRAY, INC.) 19 April 2001 (19.04.2001), pages 9-54.	65-68, 77 & 78.	Y,P	US 2002/0019046 A1 (YUAN et al) 14 February 2002 (14.02.2002), paragraphs 0009-0024 & 0033-0060 and Figures 1-3.	70.
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X,P — Y,P	WO 01/46407, A1 (LEXICON GENETICS INCORPORATED) 28 June 2002 (28.06.2001), SEQ IDs NOS:1-4, pages 2-8 and 10-21, and claims 1-3.	1-15, 17, 19-21, 24-42, 44-47, 56-61, 68 & 69. — 48, 65-67, 70-78 & 104.															
X,P — Y,P	WO 01/98468 A2 (CYCTE GENOMICS INC.) 27 December 2001 (27.12.2001), SEQ IDs NOS:20 & 41, and pages 9-43, 64, 67, 69-81, 84-86, 89, 103 & 114, see particularly pages 19, 89, 103 & 114.	1-15, 17, 19-22, 24-42, 44-48, 56-61, 68, 69, 71-76 & 104. — 15, 18, 23, 65-67, 70, 77 & 78.															
Y,P	WO 01/27642 A2 (SUPERARRAY, INC.) 19 April 2001 (19.04.2001), pages 9-54.	65-68, 77 & 78.															
Y,P	US 2002/0019046 A1 (YUAN et al) 14 February 2002 (14.02.2002), paragraphs 0009-0024 & 0033-0060 and Figures 1-3.	70.															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																	
Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 22 July 2003 (22.07.2003)		Date of mailing of the international search report 31 JUL 2003															
Name and mailing address of the ISA/US Stop 1430, Rm. 1441, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer  William W. Moore Telephone No. (703)308-0196															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09039
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-42, 44-48, 56-61, 65-67, 68-70 in part, 71-78, & 104.
Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet(1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/09039

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-42, 44-48, 56-61, 65-67, in part 68-70, 71-78, and 104, drawn to a first product a CVSP14 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof, as well as conjugates and solid supports comprising same, to a first method of making the product utilizing a nucleic acid encoding a CVSP14 or catalytic domain thereof and vectors and host cells comprising said nucleic acid and solid supports comprising same, and to a first method of use of the first product in a method for identifying a compound capable of modulating the proteolytic activity of the first product.

Group II, claim 43, drawn to a second product, a transgenic animal, sustaining a deletion or inactivating mutation of protease-encoding gene.

Group III, claims 49 and 50, drawn to a third product, a nucleic acid molecule that is antisense to a portion of a protease-encoding gene.

Group IV, claims 51 and, in part 68-70, drawn to a fourth product, an oligonucleotide portion of a protease-encoding gene and to a solid support comprising same.

Group V, claims 52-55, drawn to a fifth product, an antibody that specifically binds to a CVSP14 polypeptide-like protease.

Group VI, claims 62-64, drawn to a sixth product, a composition comprising an inhibitor of a CVSP14 polypeptide-like protease together with either an anti-tumor or an anti-angiogenic agent.

Group VII, claims 79-84, drawn to a second use of the first product in a method for identifying a compound capable of specifically binding to a CVSP14 polypeptide-like protease.

Group VIII, claims 85-89, drawn to a third use of the first product in a method for identifying a compound capable of activating the zymogen form of a CVSP14 polypeptide-like protease.

Group IX, claims 90-96, drawn to a first use of a seventh product, an inhibitor of the activity of a CVSP14 polypeptide-like protease, or activation of its zymogen, in a method of treating or preventing neoplastic diseases including tumor initiation, growth or progression, or a malignant or pre-malignant conditions.

Group X, claim 97, drawn to a fourth use of the first product in a method for identifying a compound that binds preferentially either to a single-chain or to a two-chain form of a CVSP14 polypeptide-like protease.

Group XI, claims 98 and 99, drawn to a first method of use of an eighth, unspecified, product in detecting a neoplastic disease.

Group XII, claims 100-103, drawn to a first method of use of a ninth, unspecified, product in diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, or a malignancy, or another pathological condition.

Group XIII, claim 105, drawn to a tenth product, a transgenic animal comprising a nucleic acid sequence encoding a CVSP14 polypeptide-like protease.

Group XIV, claims 106 and 107, drawn to an eleventh product, a polypeptide comprising a peptide consisting essentially of the signal sequence of the CVSP14 polypeptide from position 1 through position 25, inclusive, of SEQ ID NO:13 and to a nucleic acid sequence encoding same useful in a recombinant method of making a polypeptide. The inventions listed as Group I and Groups II-VI, IX, XI-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group I, a proteolytically active

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/09039

CVSP14 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof is neither shared nor required in a product of Groups II-VI, IX, XI-XIV, which lack this same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group I and Groups VII, VIII, and X do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of the method of Group I requires a proteolytically active CVSP14 polypeptide-like protease, or catalytic domain thereof, a substrate thereof, and a compound acting directly on the protease or catalytic domain thereof, which latter component, a compound inhibitory to the CVSP14 polypeptide-like protease, or catalytic domain thereof, is not included in methods of Groups VII and VIII, or is optional in a method of Group X, and because no method of Groups VII, VIII, and X, can be practiced concurrently with a method of Group I, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group II and Groups III-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group II, a transgenic animal, which is the presence of a deletion or inactivating mutation of protease-encoding gene in its chromosomes, cannot be utilized by, or included in, a product or a method of Groups III-XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group III and Groups IV-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group III, a nucleic acid molecule which is antisense to a nucleic acid molecule encoding a proteolytically active CVSP14 polypeptide-like protease or catalytic domain, requires that it not encode such a protease, thus cannot be utilized by, or included in, a product or a method of Groups IV-XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group IV and Groups V-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group IV, an oligonucleotide portion of a protease-encoding gene, does not require that it encode a functional, proteolytically active, CVSP14 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof, thus cannot be utilized by, nor is it specifically required in, a product or a method of Groups V-XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group V and Groups VI-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group V, an antibody, is that of specifically binding to a CVSP14 polypeptide-like protease a proteolytically active CVSP14 polypeptide-like protease or catalytic domain thereof, is a feature neither shared nor required in a product or a method of Groups VI-XIV, which therefore lack this same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group VI and Groups VII-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group VI, the presence in a composition of an anti-tumor or an anti-oncogenic agent, is neither shared nor required in a product or a method of Groups VII-XIV, which lack this same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group VII and Groups VIII-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group VII, a method for identifying a compound capable of specifically binding to a CVSP14 polypeptide-like protease, does not require the use of a protease substrate and does not require the inhibition of any activity of a protease, thus lacks a same or corresponding special technical feature with methods of Groups VIII and X, neither can the method of Group VII be practiced concurrently with a method of Groups IX, XI or XII, nor can it be practiced with a product of Groups XIII or XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group VIII and Groups IX-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group VIII, a method for identifying a compound capable of activating the zymogen form of a CVSP14 polypeptide-like protease, does not require the use both the single-chain form of the protease and the two-chain form of the protease, thus lacks a same or corresponding special technical feature with the methods of Group X, neither can the method of Group VIII be practiced concurrently with a method of Groups IX, XI or XII, nor can it be practiced with a product of Groups XIII or XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

The inventions listed as Group IX and Groups X-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group IX, a method for preventing or treating a neoplastic disease, cannot be practiced concurrently with a method of Groups X-XII, nor can it be practiced with a product of Groups XIII or XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	PCT/US02/09039
<p>The inventions listed as Group X and Groups XI-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group X, use of a single-chain or to a two-chain form of a CVSP14 polypeptide-like protease to identify a compound that binds preferentially either to a single-chain or to a two-chain form of a CVSP14 polypeptide-like protease, cannot be practiced concurrently with a method of Groups XI or XII, nor can it be practiced with a product of Groups XIII or XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.</p> <p>The inventions listed as Group XI and Groups XII-XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group XI, a first method of use of an eighth, unspecified, product in detecting a neoplastic disease, cannot, as claimed, be practiced concurrently with a method of Group XII, nor can it be practiced with a product of Groups XIII or XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.</p> <p>The inventions listed as Group XII and Groups XIII and XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group XII, a first method of use of an ninth, unspecified, product in diagnosing the presence of a pre-malignant lesion, or a malignancy, or another pathological condition, cannot be practiced with a product of Groups XIII or XIV, which therefore lack any same or corresponding special technical feature.</p> <p>The inventions listed as Groups XIII and XIV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group XIII, a transgenic animal comprising a nucleic acid sequence encoding a CVSP14 polypeptide-like protease, need not include a product Group XIV as claimed, therefore lacks any same or corresponding special technical feature.</p>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

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 K 45/00	A 6 1 K 39/395	N	4 B 0 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00		4 B 0 6 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 K 48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 9/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 13/08		4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00		4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
C 1 2 M 1/00	C 0 7 K 16/40		
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/00	A	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 M 1/34	Z	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19		
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 9/64	C 1 2 N 9/64	Z	
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37		
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/68		
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	F	
	C 1 2 N 5/00	A	
	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 100072730

弁理士 小島 一晃

(72)発明者 エド温・エル・マディソン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州サンディエゴ、シーダークレスト・ウェイ 1 1 0 0 5
番

(72)発明者 イエー・ジュン・チャーン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア州サンディエゴ、ウエストビュー・パークウェイ 1 1 6 2
9番

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 BB41 BB50 BB51 CB01 DA36 FA11 FA29 FB01

GC10

4B024 AA01 AA11 AA19 BA14 BA53 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12
CA20 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04 GA11 GA25
HA03 HA11 HA17
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15
4B050 CC01 CC04 CC05 DD11 EE01 FF14E LL01 LL03 LL05
4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ36 QQ41 QQ44 QQ53
QQ61 QQ89 QR16 QR32 QR35 QR40 QR48 QR55 QR56 QR58
QR84 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02

4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA14
4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA87X AA90X AA93X AA93Y AB01 AC14
AC20 BA01 BA02 BA16 CA33 CA43 CA44 CA46
4C084 AA01 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DC32
NA14 ZA361 ZA362 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 CC03 DD01 EE01
4C086 AA01 AA03 BC42 BC43 CB07 DA38 EA17 EA18 MA01 MA04
NA14 ZA36 ZB26
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA20 EA51 FA71 FA72