

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、1またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 10 ないし 24 に、あるいは 1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 10 ないし 24 の補体に、ハイブリダイズする、少なくとも 30 個のヌクレオチドの単離された K L K 15 核酸分子。

【請求項 2】

(i) 配列番号 6、7、8 または 9 のアミノ酸配列と実質的な配列同一性を有する蛋白をコードする核酸配列；

(i i) 配列番号 6、7、8 または 9 のアミノ酸配列を含む蛋白をコードする核酸配列； 10

(i i i) (i) または (i i) と相補的な核酸配列；

(i v) (i) または (i i) の核酸配列の縮重形；

(v) ストリンジェントな条件下で (i)、(i i) または (i i i) の核酸配列とのハイブリッド形成能を有する核酸配列；

(v i) 配列番号 6、7、8 または 9 のアミノ酸配列を含む蛋白の、トランケーション、アナログ、アレリックまたは種バリエーションをコードする核酸配列；または

(v i i) (i)、(i i) または (i i i) のフラグメントまたはアレリックもしくは種バリエーション

を含む、単離された核酸分子。

【請求項 3】

(i) 1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 10 ないし 24 の配列を含む核酸配列（ここで、T は U とすることもできる）；

(i i) (i) に相補的な、好ましくは 1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 10 ないし 24 の完全な核酸配列に相補的な核酸配列；

(i i i) ストリンジェントな条件下で (i) または (i i) の核酸とのハイブリッド形成能を有する、好ましくは少なくとも 18 個のヌクレオチドを有する核酸；または

(i v) 遺伝コードの縮重により、コドン配列にて (i) ないし (i i i) の核酸のいずれとも異なる核酸分子

を含む、単離された核酸分子。

【請求項 4】

前記した請求項のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 5】

前記した請求項のいずれかに記載の核酸分子を含む宿主細胞。

【請求項 6】

配列番号 6、7、8 または 9 のアミノ酸配列を含む単離された蛋白。

【請求項 7】

(a) 請求項 4 に記載のベクターを宿主細胞に移し；

(b) 形質転換されていない宿主細胞から形質転換されている宿主細胞を選択し；

(c) 蛋白の発現を可能とする条件下で選択された形質転換されている宿主細胞を培養し； 40

(d) 蛋白を単離する；

ことを含む、請求項 6 に記載の蛋白の製法。

【請求項 8】

請求項 7 の方法に従って調製される蛋白。

【請求項 9】

請求項 6 に記載の蛋白のエピトープに対して特異性を有する抗体。

【請求項 10】

検出可能な物質で標識されており、生物学的試料、組織または細胞中のポリペプチドを検出するために用いられる、請求項 9 記載の抗体。

【請求項 11】

請求項 6 に記載の蛋白をコードする配列またはその一部を含む、プローブ。

【請求項 1 2】

前記した請求項のいずれかに記載の核酸分子または前記した請求項のいずれかに記載の蛋白の存在を測定することにより、請求項 6 に記載の蛋白と関連する症状を診断し、かつモニター観察する方法。

【請求項 1 3】

症状が癌であるところの、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

請求項 6 に記載の蛋白と結合する物質を同定する方法であって、

- (a) その物質と蛋白とが結合しうる条件下、蛋白と、その蛋白と潜在的に結合しうる少なくとも 1 つの物質とを反応させ、
 - (b) その物質と結合した蛋白を取り出すかまたは検出し、ここで蛋白と物質の結合の検出はその物質がその蛋白と結合することを意味する、
- ことを含む、方法。

【請求項 1 5】

化合物の、請求項 6 に記載の蛋白の生物学的活性を調節する能力を評価する方法であって、物質と蛋白の間で複合体を形成することができる条件下、蛋白を、その蛋白と結合する物質および試験化合物と一緒にし、複合体を取り出しおよび/または検出する、ことを含む方法。

【請求項 1 6】

K L K 1 5 関連蛋白の相互作用の阻害剤の同定方法であって、

- (a) K L K 1 5 関連蛋白、および K L K 1 5 関連蛋白と結合する物質、またはその各々が相互作用する少なくとも一部分を含む反応混合物を得；
 - (b) その反応混合物を 1 またはそれ以上の試験化合物と接触させ；
 - (c) K L K 1 5 関連蛋白と物質との相互作用を阻害する化合物を同定する、
- ことを含む方法。

【請求項 1 7】

生物学的試料中の、配列番号 6、7、8 または 9 のアミノ酸配列を含む蛋白をコードする核酸分子を検出する方法であって、

- (a) 請求項 1 の核酸分子を生物学的試料の核酸にハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させ；および
 - (b) そのハイブリダイゼーション複合体を検出し、ここでハイブリダイゼーション複合体の存在は該蛋白をコードする核酸分子が生物学的試料中に存在することと関連している、
- ことを含む方法。

【請求項 1 8】

ハイブリダイゼーション工程に付す前に、生物学的試料の核酸をポリメラーゼ連鎖反応により増幅させるところの、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

個体での癌の進行をモニター観察する方法であって、

- (a) K L K 1 5 関連蛋白に結合する一定量の抗体を、個体由来の試料と接触させ、抗体と K L K 1 5 関連蛋白を含む二元複合体を試料中で形成させ；
 - (b) 試料中での複合体の形成の存在またはその量を測定または検出し；
 - (c) その後、適切な時点で、工程 (a) および (b) を繰返し；
 - (d) 工程 (b) の結果と、工程 (c) の結果を比較する、ここで複合体の形成量の違いは個体における癌の進行を意味する、
- ことを含む方法。

【請求項 2 0】

請求項 6 に記載の蛋白により媒介される症状の治療方法であって、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法により同定される有効量の化合物を投与することを含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

症状が癌であるところの、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

1 またはそれ以上の、前記した請求項のいずれかに記載の核酸分子または蛋白、あるいは前記した請求項のいずれかに記載の方法を用いて同定される物質または化合物、および医薬上許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む、組成物。

【請求項 2 3】

1 またはそれ以上の、前記した請求項のいずれかに記載の核酸分子または蛋白、あるいは前記した請求項のいずれかに記載の方法を用いて同定される物質または化合物の、請求項 6 に記載の蛋白または請求項 1 に記載の核酸分子が媒介する症状を治療するための医薬組成物の調製における使用。

10

【請求項 2 4】

創薬事業を行う方法であって、

(a) 1 またはそれ以上の検定システムを用いて、K L K 1 5 関連蛋白とK L K 1 5 関連蛋白に結合する物質の相互作用を阻害または亢進するその能力により薬剤を同定し；

(b) 工程 (a) にて同定された薬剤、またはそのさらなるアナログを、動物における効能および毒性について薬物学的プロファイリングに付し；および

(c) 許容される薬物学的プロファイリングを有するものとして、工程 (b) にて同定された 1 またはそれ以上の薬剤を含む医薬調製物を処方する

ことを含む、方法。

20

【請求項 2 5】

ワクチンを投与した対象にて請求項 6 に記載の蛋白と拮抗する抗体の産生を刺激または亢進するためのワクチン。

【請求項 2 6】

請求項 6 に記載の蛋白と拮抗する抗体の産生を対象にて刺激または亢進するための方法。

【請求項 2 7】

抗体の産生を刺激または亢進するのに効果的な用量にて請求項 2 5 に記載のワクチンを対象に投与することを含む、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

癌の治療、予防または再発の遅延に効果的な用量にて、請求項 2 5 に記載のワクチンを対象に投与することを含む、癌の治療、予防または再発の遅延方法。

30

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(技術分野)

本発明は核酸分子、かかる核酸分子によりコードされる蛋白、および該蛋白および核酸分子の使用に関する。

【0 0 0 2】

(従来技術)

カリクレインは、多種の組織および生体液に見られる、一群のセリンプロテアーゼである。「カリクレイン」なる語は、脾臓（ギリシャ語で「カリクレアス」）にて高濃度のそのオリジナルの単離体を見つけた、パールらによって初めて導入された（1、2）。カリクレインは2つの主要な群；シングル遺伝子である、血漿カリクレイン（3）と、齧歯動物にてラージマルチ遺伝子によりコードされる、組織カリクレイン（4、5）に分けられる。現在まで、ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーはわずか3つのメンバーで構成されていると考えられていた（6）。しかし、カリクレイン遺伝子ファミリーの11種の新たなメンバーが同定された（7 - 18）。最近になって、この分野における研究の進行状況が報告された（7）。

40

前立腺癌を診断およびモニターリングするのに、現在、最も有用な腫瘍マーカーである前立腺特異的抗原（P S A）は、セリンプロテアーゼのヒトカリクレイン遺伝子ファミリーのメンバーである（19、20）。P S Aに加えて、前立腺癌に対するアジュバント性診

50

断用マーカーとして、ヒト腺カリクレイン 2 (K L K 2 遺伝子によりコードされる、h K 2) が提案されている (2 1、2 2)。さらには、広範囲に及ぶカリクレイン遺伝子ファミリーの他のメンバーが悪性腫瘍と関連している可能性のあることを示す証拠も累積している (7)。正常な上皮細胞特異的 1 遺伝子 (N E S 1) (ヒト組織カリクレイン遺伝子命名法によれば、K L K 1 0) が、肺癌の進行の間にダウンレギュレートする、新規な腫瘍抑制物質であることが判明した (2 3)。ザイム (K L K 6)、ニューロプシン (K L K 8) およびヒト角質層キモトリプシン酵素 (H S C C E ; K L K 7) を含む、遺伝子ファミリーの他のメンバーもまた、特定の型の悪性腫瘍において特異的に発現されることが判明した (2 4 - 2 6)。

【 0 0 0 3 】

10

(発明の開示)

本発明者らは新規なカリクレインをコードする核酸分子を同定した。その核酸分子を染色体 1 9 q 1 3 . 3 - q 1 3 . 4 にマッピングし、k l k 1 と k l k 3 遺伝子の間に位置付ける。「k l k 1 5」と称される新規な核酸分子は 3 つの別個にスプライスされた形態を有し、それは主に甲状腺にて発現され、それよりも僅かであるが、前立腺、唾液腺および副腎、結腸、精巣および腎臓にて発現される。その核酸の発現は前立腺癌にてアップレギュレートされ、L N C a P 前立腺癌細胞系にてステロイドホルモンの制御下にある。k l k 1 5 の高発現は、より悪性 (高期および高等級) の前立腺癌と関連している。

本明細書に記載の新規なカリクレインを、「カリクレイン 1 5」、「K L K 1 5」または「K L K 1 5 蛋白」という。該蛋白をコードする遺伝子を「k l k 1 5」という。

20

概して言えば、本発明は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下、1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 1 0 ないし 2 4 に、あるいは 1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 1 0 ないし 2 4 の補体に、ハイブリダイズする、少なくとも 3 0 個のヌクレオチドの単離された K L K 1 5 核酸分子に関する。

【 0 0 0 4 】

本発明はまた、K L K 1 5 蛋白のトランケーション、K L K 1 5 蛋白またはそのトランケーションのアナログもしくは同族体をコードする配列を含む、核酸分子を意図する。(K L K 1 5 蛋白ならびに K L K 1 5 蛋白のトランケーション、アナログおよび同族体をまた、包括的に、「K L K 1 5 関連蛋白」という。)

本発明の核酸分子は、適当な発現ベクター、すなわち、挿入されたコード化配列を転写および翻訳するための必須の因子を含有するベクター、の中に挿入することもできる。したがって、本発明の核酸分子ならびに該核酸分子に連結した 1 またはそれ以上の転写および翻訳因子を含む、宿主細胞の形質転換に適する組換え発現ベクターを構築することもできる。

30

組換え発現ベクターを用いて K L K 1 5 関連蛋白を発現する形質転換された宿主細胞を調製することができる。したがって、本発明はさらに本発明の組換え分子を含有する宿主細胞を提供する。本発明はまた、その生殖細胞および体細胞が本発明の核酸分子、特に K L K 1 5 蛋白のアナログまたは K L K 1 5 蛋白のトランケーションをコードする分子を含む組換え分子を含有する、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を意図する。

【 0 0 0 5 】

40

本発明はさらに本発明の精製かつ単離された核酸分子を用いて K L K 1 5 関連蛋白を調製する方法を提供する。一の具体例において、(a) 本発明の組換え発現ベクターを宿主細胞に移し；(b) 形質転換されていない宿主細胞から形質転換されている宿主細胞を選択し；(c) K L K 1 5 関連蛋白の発現を可能とする条件下で選択された形質転換されている宿主細胞を培養し；(d) K L K 1 5 関連蛋白を単離する；ことを含む、K L K 1 5 関連蛋白を調製する方法が提供される。

本発明は、さらに広範囲に、配列番号 6、7、8 または 9 のアミノ酸配列を含む、単離された K L K 1 5 蛋白も意図する。

本発明の K L K 1 5 関連蛋白は、他の分子、例えば蛋白と接合し、融合蛋白を調製することもできる。このことは、例えば、N - 末端または C - 末端融合蛋白を合成することによ

50

り達成することができる。

【0006】

本発明はさらに、本発明の K L K 1 5 関連蛋白のエピトープに対して特異性を有する抗体を意図する。抗体を検出可能な物質で標識化し、それを用いて組織または細胞中にある本発明の蛋白を検出することができる。抗体は、例えば、腫瘍細胞と、コンジュゲートおよびイムノトキシンにて反応させる療法にて、化学療法薬、トキシン、免疫学的応答修飾因子、酵素および放射性同位元素を含む、抗腫瘍作用を有する種々の薬剤の標的とする選択的担体としての用途を有する。

本発明はまた、本発明の核酸分子に独特な、および/または本発明の蛋白に独特な、ヌクレオチドプローブの構築を可能とする。したがって、本発明はまた、本発明の核酸配列、または本発明の蛋白もしくはその一部をコードする核酸配列を含むプローブに関する。プローブを検出可能な物質で標識化し、それを用いてヌクレオチド配列の混合物から、本発明の蛋白の1またはそれ以上の特性を表示する蛋白をコードする核酸分子を含む、本発明の核酸分子を選択することができる。プローブを用いて腫瘍を識別してもよい。

10

【0007】

本発明はまた、例えば、センス分子に逆向きにて mRNA または DNA 鎖を産生することによって得られるアンチセンス核酸分子を提供する。アンチセンス核酸分子を用いて K L K 1 5 発現（例えば、癌性）細胞の増殖を抑制することができる。

本発明はさらに、本発明の蛋白に結合する物質を同定する方法であって、その物質と蛋白との間で複合体を形成することができる条件下、蛋白と、その蛋白と潜在的に結合しうる少なくとも1つの物質とを反応させ、結合を検出することを含む、方法を提供する。結合は、複合体を、遊離物質を、または非複合蛋白を検定することにより検出することができる。本発明はまた、K L K 1 5 関連蛋白と相互作用する他の細胞内蛋白と結合する物質を同定する方法を意図する。K L K 遺伝子制御配列（例えば、プロモーター配列）と結合する化合物を同定する方法を利用することもできる。

20

【0008】

その上さらに、本発明は、化合物の、本発明の K L K 1 5 関連蛋白の生物学的活性を調節する能力について評価する方法を提供する。例えば、蛋白と、該蛋白と結合する物質の相互作用を阻害または亢進する物質を評価することもできる。一の具体例において、該方法は、物質と蛋白の間で複合体を形成することができる条件下、既知の濃度の K L K 1 5 関連蛋白を、該蛋白と結合する物質および試験化合物と一緒にし、複合体を取り出しおよび/または検出する、ことを含む。

30

本発明の蛋白の生物学的活性を調節する化合物はまた、本発明の方法を用い、該化合物の存在、および不存在の下で、本発明の蛋白の組織および細胞中での発現のパターンおよびレベルを比較することによって同定することもできる。

【0009】

本発明の蛋白、抗体、アンチセンス核酸分子、および本発明の方法を用いて同定される物質および化合物、ならびに本発明のペプチドを用いて、本発明の K L K 関連蛋白の生物学的活性を調節してもよく、それらは対象における癌（特に、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、精巣癌）などの障害および甲状腺障害の治療にて用いることもできる。したがって、該物質および化合物は、一の対象にて、癌（特に、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、精巣癌）などの障害および甲状腺障害を患っている個体に投与するための組成物に処方することができる。特に、この抗体、アンチセンス核酸分子、物質および化合物を用いて、癌細胞中に、または癌細胞上に K L K 1 5 関連蛋白を有する患者を治療することができる。

40

したがって、本発明はまた、1またはそれ以上の本発明の蛋白、あるいは本発明の方法を用いて同定される物質または化合物と、医薬上許容される担体、賦形剤または希釈体とを含む組成物に関する。対象における癌（特に、前立腺癌、甲状腺癌、直腸癌、腎臓癌、精巣癌）などの障害および甲状腺障害を治療または予防する方法であって、その治療または予防を必要とする患者に、本発明の K L K 1 5 関連蛋白、本発明の方法を用いて同定される物質または化合物、あるいは本発明の組成物を投与することを含む方法もまた提供され

50

る。

【0010】

本発明のもう一つ別の態様は、癌を予防し、および／または癌を治療する、特にその細胞にて検出されるK L K 1 5 関連蛋白を有する患者にて癌を予防および／または治療するためのワクチンの調製にて用いるための、K L K 1 5 関連蛋白、その蛋白より誘導されるペプチドまたは化学的に産生された（合成）ペプチド、あるいはこれらの分子を組み合わせることで用いることである。また、これらのワクチン調製物を用いて、患者が腫瘍を発病する前に予防することもできる。

本発明は、概して、ワクチンを投与する対象にて、K L K 1 5 関連蛋白に拮抗する抗体の産生を刺激または亢進するためのワクチンを意図する。

10

本発明はまた、対象においてK L K 1 5 関連蛋白に拮抗する抗体の産生を刺激または亢進するための方法を提供する。該方法は本発明のワクチンを抗体の産生を刺激または亢進する有効な用量にて対象に投与することを含む。

【0011】

さらには、本発明は、癌の治療、予防または再発遅延の方法を提供する。この方法はその対象に本発明のワクチンを癌の治療、予防または再発遅延に有効な用量にて投与することを含む。

他の具体例において、本発明は、K L K 1 5 関連蛋白の相互作用の阻害剤を同定する方法であって、

（a）K L K 1 5 関連蛋白、およびK L K 1 5 関連蛋白と結合する物質、またはその各々が相互作用する少なくとも一部分を含む反応混合物を得；

20

（b）その反応混合物を1またはそれ以上の試験化合物と接触させ；

（c）K L K 1 5 関連蛋白と物質との相互作用を阻害する化合物を同定する、ことを含む方法を提供する。

【0012】

ある種の好ましい具体例において、その反応混合物は全細胞である。他の具体例において、その反応混合物は細胞溶菌液または精製された蛋白組成物である。本発明の方法は試験化合物のライブラリーを用いて行うことができる。かかる作用物質は蛋白、ペプチド、核酸、炭水化物、有機小分子ならびに動物、植物、真菌および／または微生物から単離された抽出物などの天然産物抽出物ライブラリーとすることができる。本発明のもう一つ別の態様は、創薬事業を実施する方法であって、

30

（a）K L K 1 5 関連蛋白と、その蛋白と結合する物質との相互作用を阻害または強化するその能力により作用物質を同定するための1またはそれ以上の検出システムを準備し；

（b）工程（a）にて同定された作用物質、またはそのさらなる類似体の、動物における効能および毒性について治療的プロファイリングを行い；そして

（c）許容される治療的プロファイルを有するものとして、工程（b）にて同定された1またはそれ以上の作用物質を含む、医薬調製物を処方する

ことを含む方法を提供する。

ある種の具体例において、本発明の方法は、販売用の医薬調製物を分配するシステムを確立する工程を含むことができ、所望により医薬調製物を売買するための販売グループを確立することを含んでいてもよい。

40

【0013】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な記載から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の精神および範囲内にある種々の変形および修飾はこの詳細な記載から当業者に明らかになるであろうから、本発明の好ましい具体例を示唆する詳細な記載および具体的な実施例は例示として記載されているにすぎないということを認識すべきである。

【0014】

（図面の簡単な記載）

本発明を図面との関連において説明する。

50

図 1 は K L K 1 5 遺伝子のゲノム機構および部分的ゲノム配列を示す。スプライシング部位の領域を除いてイントロン配列は図示されていない。イントロンを小文字で示し、エクソンを大文字で示す。コーディングヌクレオチドを太文字で示し、3' 非翻訳領域が T G A 停止コドン (丸で囲んだ) の後続く。コーディング領域の翻訳されたアミノ酸を 1 文字標記を用いて下段に示す。開始および停止コドンを丸で囲み、エクソン - イントロン部位に下線を付す。触媒残基を四角で囲む。推定ポリアデニル化シグナルに下線を付す。第 1 のコーディングエクソンの正確な開始コドンは決定されなかった。

【 0 0 1 5 】

図 2 は、K L K 1 5 の推定アミノ酸配列と、カリクレインマルチ遺伝子ファミリーのメンバー (配列番号 2 5 - 3 8) との位置合わせを示す。ダッシュ記号は配列の位置がよりよく合致するようにギャップを設けたことを意味する。触媒トリアドの残基 (H、D、S) をイタリックで示す。同じアミノ酸を黒色で強調し、類似する残基を灰色で浮き彫りにする。29 個の不変セリンプロテアーゼ残基を各ブロックの底部に (・) で印を付け、システイン残基を各ブロックの頭部に (+) で印を付ける。シグナルおよび活性化ペプチドの推定される切断部位を矢印で示す。点線の領域はカリクレインループ配列を示す。「D」残基の存在により推定されるトリプシン様切断パターンを (*) で示す。K L K 1 5 はこの位置に「E」を有する。独特な 8 個のアミノ酸の配列、H N E P G T A G (配列番号 1 0) が K L K 1 5 遺伝子の 1 4 8 - 1 5 5 位置にある。

10

【 0 0 1 6 】

図 3 は、前立腺特異的抗原 (P S A) と比較した場合の、K L K 1 5 蛋白の疎水性および親水性をプロットしたものである。アミノ末端の疎水性領域がシグナルペプチドの存在を示唆していることに注意すること。

20

【 0 0 1 7 】

図 4 は、15 種のカリクレインと他のセリンプロテアーゼについて、推定される系統樹を示す。隣接結合法を用いて K L K 1 5 を他のセリンプロテアーゼおよびカリクレイン遺伝子ファミリーのメンバーと並べた。その系統樹は古典的カリクレイン (h K 1、h K 2 および P S A) を一緒にグループ分けし、K L K 1 5 を T L S P および K L K - L 3 遺伝子と一緒に一のグループに並べた。他のセリンプロテアーゼを図示するように異なるグループに並べた。K L K はカリクレインを示し; K L K - L はカリクレイン様を示し; T L S P はトリプシン様セリンプロテアーゼを示し; N E S 1 は正常な上皮細胞特異的遺伝子を示し; P S A は前立腺特異的抗原を示し; h K 1 および h K 2 は、各々、ヒト甲状腺カリクレイン 1 および 2 を示し; H S C C E はヒトキモトリプシン酵素をいう。

30

【 0 0 1 8 】

図 5 は、K L K 1 5 遺伝子の種々のスプライス変種の模式図である。エクソンをボックスで示し、イントロンを連結線で示す。ボックス内の数字はエクソンの長さを塩基対で示す。矢印は共通開始コドン位置を示し、星印は停止コドン位置を示す。推定されるポリペプチド産物の長さを、各変種の横にアミノ酸 (A A) の数にて示す。スプライシングおよび/またはエクソンスキップにより、フレームシフトが生じ、それにより成熟前の終結がもたらされる。

【 0 0 1 9 】

図 6 は、染色体 1 9 q 1 3 . 3 - q 1 3 . 4 上の K L K 1、K L K 1 5 および K L K 3 遺伝子の相対的位置を示す。2 つのオーバーラップ B A C クローンを同定し、そのオーバーラップ領域に平行線を付す。遺伝子をコーディング配列の方向を意味する横方向の矢印で示す。遺伝子の間の距離は塩基対で示す。図は尺度で表されていない。

40

【 0 0 2 0 】

図 7 は、R T - P C R で測定した、K L K 1 5 遺伝子の組織発現を示す。K L K 1 5 は主に甲状腺で発現され、それより少ない量にて前立腺、唾液腺および副腎、結腸、精巣および腎臓で発現される。M は分子量マーカーである。マルチプル P C R バンド (別途、スプライスされた形態) を説明するために、実施例を参照のこと。P C R はプライマー K L K 1 5 - F 2 および K L K 1 5 - R 1 を用いて行った。

50

【0021】

図8はLNCaP前立腺癌細胞系におけるKLK15遺伝子のホルモン調節を示す。DHTはジヒドロテストステロンである。ステロイドを 10^{-8} Mの最終濃度で加えた。(-ve)は負の対照である。アクチンを対照遺伝子として用いた。

【0022】

図9は15種のカリクレイン遺伝子のコーディング領域を比較した模式図である。エクソンを充実線で示し、イントロンを連結線で示す。ボックスの上にある文字はすべての遺伝子に保存されていることが判明した触媒トリアドの相対的位置を示す；Hはヒスチジンを示し、Dはアスパラギン酸を示し、Sはセリンを意味する。ローマ数字はイントロン位相を示す。イントロン位相とはコドン内にあるイントロンの位置をいい；Iはイントロンが第1ヌクレオチドのコドンの後に生じることを意味し、IIはイントロンが第2ヌクレオチドの後に生じることを意味し、0はイントロンがコドンの間に生じることを意味する。イントロン位相はすべての遺伝子において保持されている。ボックス内の数字はエクソンの長さを塩基対で示すものである。括弧内の名称はヒト遺伝子学名委員会により承認されている正式な名称である。非翻訳3'および5'領域および5'非翻訳エクソンは図示せず。

【0023】

(発明を実施するための形態)

本発明によれば、当該分野の技術の範囲内にある、通常の分子生物学的技法、微生物学的技法および組換えDNA技法を利用することができる。かかる技法は刊行物に詳しく説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover 編、1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 編、1984); Nucleic Acid Hybridization B.D. Hames & S.J. Higgins 編 (1985); Transcription and Translation B.D. Hames & S.J. Higgins 編 (1984); Animal Cell Culture R.I. Freshney 編 (1986); Immobilized Cells and Enzymes IRL Press (1986); および B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) を参照のこと。

【0024】

1. 本発明の核酸分子

前記したように、本発明はKLK15蛋白をコードする配列を有する単離された核酸分子を提供する。「単離された」なる語は、核酸が、組換えDNA技法により産生される場合に、実質的に細胞物質または培地のない、あるいは化学的に合成される場合に、実質的に化学反応物または他の化合物のないことをいう。「単離された」核酸はまた、天然において核酸が側面に付加されていない配列（すなわち、核酸分子が5'および3'末端に位置する配列）であって、それから核酸が誘導されるものであってもよい。「核酸」なる語は、DNAおよびRNAを含むものであり、二本鎖または一本鎖のいずれとすることもできる。一の具体例において、本発明の核酸分子は、配列番号6、7、8または9のアミノ酸配列を含む蛋白をコードし、好ましくは、本発明の核酸分子は、1またはそれ以上の配列番号1ないし5、または10ないし24の核酸配列を含む。

【0025】

一の具体例において、本発明は、単離された核酸分子であって、

(i) 配列番号6、7、8または9のアミノ酸配列と実質的な配列同一性を有する蛋白をコードする核酸配列；

(ii) 配列番号6、7、8または9のアミノ酸配列を含む蛋白をコードする核酸配列；

(i i i) (i) または (i i) と相補的な核酸配列 ;
 (i v) (i) または (i i) の核酸配列の縮重形 ;
 (v) ストリンジェントな条件下で (i) 、 (i i) または (i i i) の核酸配列とのハイブリッド形成能を有する核酸配列 ;
 (v i) 配列番号 6 、 7 、 8 または 9 のアミノ酸配列を含む蛋白の、トランケーション、アナログ、アレリックまたは種バリエーションをコードする核酸配列 ; または
 (v i i) (i) 、 (i i) または (i i i) のフラグメントまたはアレリックもしくは種バリエーションを含む、単離された核酸分子を提供する。

【 0 0 2 6 】

10

好ましくは、本発明の精製かつ単離された核酸分子は、

(i) 1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 1 0 ないし 2 4 の配列を含む核酸配列 (ここで、T は U とすることもできる) ;

(i i) (i) に相補的な核酸配列、好ましくは 1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 または 1 0 ないし 2 4 の全長核酸配列に相補的な核酸配列 ;

(i i i) ストリンジェントな条件下で (i) または (i i) の核酸とのハイブリッド形成能を有する、好ましくは少なくとも 1 8 個のヌクレオチドを有する核酸 ; または

(i v) 遺伝コードの縮重により、コドン配列にて (i) ないし (i i i) の核酸のいずれとも異なる核酸分子

を含む。

20

本発明は、配列番号 6 、 7 、 8 または 9 のアミノ酸配列を含む蛋白をコードする核酸に相補的な核酸配列、好ましくは 1 またはそれ以上の配列番号 1 ないし 5 、 または 1 0 ないし 2 4 の全長核酸配列に相補的な核酸配列を含む。

【 0 0 2 7 】

本発明は、本発明の核酸配列と実質的に同一のまたは相同的な配列を有する核酸分子、あるいは配列番号 6 、 7 、 8 または 9 のアミノ酸配列と実質的に同一または類似の蛋白をコードする配列を有する核酸分子を包含する。好ましくは、この核酸は実質的に配列が同一であること、例えば、少なくとも 5 0 % 、 5 5 % 、 6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % または 8 5 % の核酸同一性、より好ましくは 9 0 % の核酸同一性 ; および最も好ましくは少なくとも 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % の配列同一性を有する。当該分野にて公知であり、本明細書で使用する「同一性」なる語は、配列を比較することにより測定される、2 またはそれ以上のアミノ酸配列または 2 またはそれ以上の核酸配列の間の関係である。場合によっては、かかる配列の鎖を対合することにより測定されるような、アミノ酸または核酸配列の間の配列の程度の程度をいうこともある。同一性および類似性は当業者に周知の用語であり、慣用的方法により計算することができる (例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編, Oxford University Press, New York, 1988 ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編, Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. and Griffin, H. G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. Academic Press, 1987 ; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編, M. Stockton Press, New York, 1991, Carillo, H. および Lipman, D., SIAM J. Applied Math. 48 : 1073, 1988 を参照のこと) 。配列間で最大の対合が得られるように設計された方法が、一般に、好ましい。同一性および類似性を決定する方法は、GCG プログラムパッケージ (Devereux J. ら、Nucleic Acids Research 12 (1) : 38

30

40

50

7、1984) ; B L A S T P、B L A S T NおよびF A S T A (A t s c h u l , S . F . ら、J . M o l e c . B i o l . 215 : 403 - 410、1990) を含む、公に入手可能なコンピュータプログラムにて体系化されている。B L A S T X プログラムはN C B I および他の供給会社 (B L A S T M a n u a l , A l t s c h u l , S . ら、N C B I N L M N I H B e t h e s d a , M d . 20894 ; A l t s c h u l , S . ら、J . M o l . B i o l . 215 : 403 - 410、1990) から公に入手可能である。

【0028】

K L K 15 蛋白をコードし、遺伝的コードにおける縮重のために本発明の核酸配列と異なる配列を有する、単離された核酸分子もまた、本発明の範囲内にある。かかる核酸は機能的に等価な蛋白 (例えば、K L K 15 蛋白) をコードするが、その配列は遺伝的コードにおける縮重のために K L K 15 蛋白の配列と異なる。一例として、K L K 15 蛋白のヌクレオチド配列の範囲内にある D N A 配列多型はアミノ酸配列に影響を及ぼさないサイレント変異をもたらす可能性がある。1 またはそれ以上のヌクレオチドにおける変形が、天然の対立遺伝子変形のために、一の集団にある個々の間で存在してもよい。いずれの、そしてすべての核酸変形は本発明の範囲内にある。K L K 15 蛋白のアミノ酸配列にて変化をもたらす D N A 配列多型が起るかもしれない。これらのアミノ酸多型もまた本発明の範囲内にある。

10

【0029】

本発明のもう一つ別の態様は、ストリンジェントな条件下で、好ましくは高ストリンジェントな条件下で、配列番号 6、7、8 または 9 に示されるアミノ酸配列を有する K L K 15 蛋白をコードする配列を含む核酸分子とハイブリッド形成する核酸分子を提供することである。D N A ハイブリダイゼーションを促進する適当にストリンジェントな条件は当業者に公知であり、あるいは C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , N . Y . (1989) 6 . 3 . 1 - 6 . 3 . 6 に見ることができる。例えば、約 45 で 6 . 0 x 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (S S C) の、つづいて 50 で 2 . 0 x S S C の洗浄を利用することができる。ストリンジェンシーは洗浄工程にて用いる条件に応じて選択することができる。一例として、洗浄工程の塩濃度は 50 で約 2 . 0 x S S C の高ストリンジェンシーから選択することができる。加えて、洗浄工程の温度は約 65 の高ストリンジェントな条件とすることもできる。

20

30

【0030】

本発明は、本明細書に記載されている、K L K 15 蛋白のトランケーション、および K L K 15 蛋白のアナログを含め、K L K 関連蛋白をコードする核酸分子を包含する。トランケートされている核酸または核酸フラグメントは、配列番号 1 のヌクレオチド 1 5 8 1 - 1 6 2 3、1 5 2 4 - 5 2 5 8、5 2 5 9 - 5 4 1 2、5 4 1 3 - 5 9 1 2、5 9 1 3 - 6 0 7 8、6 1 9 7 - 6 3 1 6、6 0 7 9 - 6 3 1 6、6 3 1 7 - 6 4 5 3、6 4 5 4 - 7 1 2 6、6 0 7 9 - 7 1 2 6、7 1 2 7 - 7 7 8 6、5 9 1 3 - 6 1 9 6、7 1 2 7 - 7 1 3 1 または 7 1 2 7 - 7 2 7 9 あるいは配列番号 39、47、48、49 または 50 からなる、またはのみからなる配列に対応させることができる。本発明の c D N A に対応する m R N A を可変プライシングに付すことにより得られる本発明の核酸分子の変異形態も本発明により保護される (例えば、配列番号 3、4 および 5 を参照のこと)。

40

【0031】

D N A を含む、本発明の単離された核酸分子は、本発明の核酸配列のすべてまたは一部を基礎として標識された核酸プローブを調製することにより単離することができる。その標識された核酸プローブを用いて適当な D N A ライブラリー (例えば、c D N A またはゲノム D N A ライブラリー) をスクリーンする。例えば、c D N A ライブラリーを用い、そのライブラリーを標準的技法を用いて標識されたプローブでスクリーニングに付すことにより K L K 15 関連蛋白をコードする c D N A を単離することができる。また、ゲノムライブラリーを同様にしてスクリーニングに付し、K L K 15 関連蛋白をコードする遺伝子を

50

含むゲノムクローンを単離することができる。cDNAまたはゲノムDNAライブラリーのスクリーニングにより単離された核酸は標準的技法により配列決定することができる。

【0032】

DNAである本発明の単離された核酸分子はまた、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）方法およびcDNAまたはゲノムDNAを用い、KLK15関連蛋白をコードする核酸を選択的に増幅することによって単離することもできる。PCRにて用いるために本発明のヌクレオチド配列から合成オリゴヌクレオチドプライマーを設計することも可能である。核酸はこれらのオリゴヌクレオチドプライマーおよび標準的PCR増幅技法を用いてcDNAまたはゲノムDNAから増幅させることができる。こうして増幅された核酸を適当なベクターにクローンし、DNA配列分析により特徴付けることができる。cDNAは、種々の方法により、例えば、Chirgwinら、Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)のグアニジニウム-チオシアナート抽出操作を用いることで、細胞mRNA全体を単離することにより、mRNAから調製することができる。ついで、逆転写酵素（例えば、MD、Bethesda、Gibco/BRLから入手可能なMoloney MLV逆転写酵素、またはFL、St. Petersburg、Seikagaku America, Inc.から入手可能なAMV逆転写酵素）を用いてmRNAからcDNAを合成する。

10

【0033】

RNAである本発明の単離された核酸分子は、KLK15関連蛋白をコードするcDNAを、そのcDNAの転写を可能とし、KLK15関連蛋白をコードするRNA分子を産生する、適当なベクターにクローンすることにより単離することができる。例えば、cDNAをベクターのバクテリオファージプロモーター（例えば、T7プロモーター）の下流にクローン化させ、cDNAをT7ポリメラーゼでインビトロにて転写させ、得られたRNAを慣用的技法により単離することができる。

20

本発明の核酸分子は標準的技法を用いて化学的に合成することができる。限定するものではないが、ペプチド合成と同様に、市販のDNAシンセサイザーで完全に自動化されている、固相合成を含め、ポリデオキシヌクレオチドを化学的に合成する方法が知られている（例えば、Itakuraら、米国特許第4598049号；Caruthersら、米国特許第4458066号；およびItakura、米国特許第4401796号および第4373071号を参照のこと）。

30

【0034】

特定の核酸分子がKLK15関連蛋白をコードするかどうかの決定は、そのcDNAを標準的技法により適当な宿主細胞にて発現させ、その発現された蛋白を本明細書に記載の方法にて試験することで行うことができる。KLK15関連蛋白をコードするcDNAは、ジデオキシヌクレオチド鎖末端配列決定法またはマキサム-ギルバート化学的配列決定法などの標準的方法により配列決定され、コードされた蛋白の核酸配列および推定アミノ酸配列を決定することができる。

KLK関連蛋白の開始コドンおよび非翻訳配列は、PC/ジン（IntelliGenetics Inc., Calif）などの、一定の目的のために設計されたコンピュータソフトウェアを用いて決定することができる。KLK15関連蛋白をコードする遺伝子のイントロン-エクソン構造および転写制御配列は、KLK15関連蛋白をコードする本発明の核酸分子を用いてゲノムDNAクローンライブラリーをプローブすることにより確認することができる。制御因子は標準的技法を用いて同定することができる。該因子の機能は、これらの因子を用いて該因子に作動的に連結するlacZ遺伝子などのレポーター遺伝子を発現させることにより確認することができる。これらの構築物を慣用的操作により培養細胞中に、またはヒト以外のトランスジェニック動物モデルに導入してもよい。DNA中の制御因子を同定することに加えて、かかる構築物を用い、当該分野にて知られている技法を利用してかかる因子と相互作用する核蛋白を同定することもできる。一の具体例において、本発明の核酸分子の制御配列は配列番号11の配列を含む。

40

【0035】

50

本発明の特定の具体例において、本明細書に記載の方法を用いて単離した核酸は K L K 1 5 変異対立遺伝子である。その変異対立遺伝子は、K L K 1 5 関連蛋白に関連する障害の徴候に起因する遺伝子型を有することが既知の、あるいは提案されているいずれかの個体から単離することができる。変異対立遺伝子および変異対立遺伝子産物は本明細書に記載の治療および診断方法にて用いることができる。例えば、K L K 1 5 変異体の遺伝子を本明細書に記載の P C R を用いて単離し、その変異対立遺伝子の D N A 配列を正常な対立遺伝子と比較し、変異体の遺伝子産物の機能の喪失または変更の原因となる変異を解明することができる。変異対立遺伝子を有すると思われる、あるいは有することが分っている個体からの D N A を用いてゲノムライブラリーを構築することもでき、あるいは変異対立遺伝子を発現することが分っている、あるいは発現すると思われる組織からの R N A を用いて c D N A ライブラリーを構築することもできる。ついで、正常な K L K 1 5 遺伝子をコードする核酸またはその適当なフラグメントを標識し、プローブとして使用してかかるライブラリー中の対応する変異対立遺伝子を同定してもよい。変異配列を含有するクローンを精製し、配列解析に付すことができる。加えて、K L K 1 5 変異対立遺伝子を発現することが既知の、あるいは発現すると思われる個体の組織から単離した R N A から由来の c D N A を用いて発現ライブラリーを構築することもできる。推定変異体組織により産生された遺伝子産物を発現させ、例えば、本明細書に記載される K L K 1 5 関連蛋白に特異的な抗体を用いてスクリーニングすることもできる。この抗体を用いて同定されたライブラリークローンを精製し、配列解析に付すこともできる。

10

20

【 0 0 3 6 】

本発明の核酸分子または該分子のフラグメントの配列をその正常な転写表示と逆にし、アンチセンス核酸分子を産生することもできる。アンチセンス核酸分子は、当該分野にて公知の操作を用いる化学的合成および酵素的ライゲーション反応を使用して構築することができる。

【 0 0 3 7 】

2. 本発明の蛋白

K L K 1 5 蛋白のアミノ酸配列は、配列番号 6、7、8 または 9 に示される配列を含む。該蛋白は主に甲状腺で発現され、さらに少ない程度で前立腺、唾液腺および副腎、結腸、精巣および腎臓にて発現される。

配列番号 6、7、8 または 9 に示されるアミノ酸配列を含む蛋白に加えて、本発明の蛋白は、K L K 1 5 蛋白のトランケーション、K L K 1 5 蛋白のアナログおよび K L K 1 5 蛋白と配列同一性または類似性を有する蛋白、ならびに本明細書に記載されるそのトランケーション（すなわち、K L K 1 5 関連蛋白）を包含する。

30

【 0 0 3 8 】

トランケートされた蛋白は、大きさがトリペプチドから 70 量体のポリペプチドまでの範囲の、3 および 70 個の間のアミノ酸残基のペプチドを含む。好ましい具体例において、このペプチドは H N E P G T A G（配列番号 10）を包含する。トランケートされた蛋白は、アミノ末端にて、限定されるものではないが、脂質 - 脂肪酸コンジュゲート、ポリエチレングリコールまたは炭水化物を含む、アミノ基（ $-NH_2$ ）、疎水基（例えば、カルボベンゾイル、ダンシルまたは T - ブチルオキシカルボニル）、アセチル基、9 - フルオレニルメトキシ - カルボニル（P M O C）基または巨大分子を有していてもよい。トランケートされた蛋白は、カルボキシ末端にて、限定されるものではないが、脂質 - 脂肪酸コンジュゲート、ポリエチレングリコールまたは炭水化物を含む、カルボキシル基、アミド基、T - ブチルオキシカルボニル基または巨大分子を有していてもよい。

40

【 0 0 3 9 】

本発明の蛋白はまた、本明細書に記載の、K L K 1 5 蛋白のアナログおよび / またはそのトランケーションを含んでいてもよく、限定されるものではないが、1 またはそれ以上のアミノ酸置換、挿入および / または欠失を含有する K L K 1 5 蛋白を包含しうる。アミノ酸置換は保存または非保存特性のものであってもよい。保存アミノ酸置換は、K L K 1 5 蛋白の 1 またはそれ以上のアミノ酸を同様の電荷、大きさおよび / または疎水性を有する

50

アミノ酸で置換することを含む。保存置換しかなされない場合、得られるアナログは、好ましくは、K L K 1 5 蛋白に機能的に均等である。非保存置換は、K L K 1 5 蛋白のアミノ酸配列の1またはそれ以上のアミノ酸を異なる電荷、大きさおよび/または疎水性を有する1またはそれ以上のアミノ酸で置換することを含む。

1またはそれ以上のアミノ酸挿入をK L K 1 5 蛋白に導入してもよい。アミノ酸挿入は単一のアミノ酸残基または長さが2ないし15個のアミノ酸の連続的なアミノ酸からなってもよい。

【0040】

欠失は1またはそれ以上のアミノ酸または不連続な部分をK L K 1 5 蛋白配列から除去することからなる。欠失されるアミノ酸は連続的であってもなくてもよい。欠失変異を有する得られたアナログの下限の長さは約10個のアミノ酸、好ましくは20ないし40個のアミノ酸である。

10

本発明の蛋白はK L K 1 5 蛋白と配列同一性または類似性を有する蛋白および/または本明細書に記載のそのランケーションを包含する。かかるK L K 1 5 蛋白は、そのアミノ酸配列が選択されたハイブリダイゼーション条件（本明細書中のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の記載を参照のこと）下でK L K 蛋白を得るのに用いられるプローブとハイブリッド形成する他の種からのK L K 1 5 蛋白領域のアミノ酸配列を含む。これらの蛋白は、一般に、K L K 1 5 蛋白の特徴である、同じ領域を有するであろう。好ましくは、蛋白は、配列番号6、7、8または9のアミノ酸配列と、実質的な配列同一性を有する、例えば、約55%、60%、65%、70%、75%、80%または85%の同一性、好ましくは90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性、最も好ましくは98%の同一性を有するであろう。アミノ酸配列の相同性、類似性または同一性の%は、本明細書に記載される既知の方法を用いて対照となる配列と対合する、位置合わせしたアミノ酸の%として計算される。

20

【0041】

本発明はまた本発明の蛋白のイソ形態を意図する。イソ形態は本発明の蛋白と同じ数および種のアミノ酸を含有するが、異なる分子構造を有する。本発明により意図されるイソ形態は本明細書に記載の本発明の蛋白と同じ特性を有することが好ましい。

本発明はまた、融合蛋白を産生するのに、選択された蛋白、またはマーカー蛋白（以下を参照のこと）と接合したK L K 1 5 関連蛋白を包含する。加えて、K L K 1 5 蛋白およびK L K 1 5 関連蛋白の免疫原性部分も本発明の範囲内である。

30

本発明のK L K 1 5 関連蛋白は組換えDNA法を用いて調製することができる。したがって、本発明のK L K 1 5 関連蛋白をコードする配列を有する本発明の核酸分子を、蛋白を良好に発現させる適当な発現ベクター中に既知の方法にて組み込むことができる。可能な発現ベクターは、限定されるものではないが、用いる宿主細胞と適合する限り、コスミド、プラスミドまたは修飾ウイルス（例えば、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス）を包含する。

【0042】

従って、本発明は、本発明の核酸分子、および挿入された蛋白 - 配列の転写および翻訳に不可欠な調節配列を含有する、本発明の組換え発現ベクターを意図する。適当な調節配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫遺伝子を含む、種々の供給源から誘導される[例えば、Goeddel、Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、CA (1990)に記載の調節配列を参照のこと]。適当な調節配列の選択は以下に記載されるように選択される宿主細胞に依存し、当業者であれば容易に行うことができる。必要不可欠な調節配列は固有のK L K 1 5 蛋白および/またはそのランキング領域から供給され得る。

40

【0043】

本発明はさらにアンチセンス方向にて発現ベクターにクローンされた本発明のDNA核酸分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子を、本発明の蛋白また

50

はそのフラグメントの核酸配列に対してアンチセンスであるDNA分子の、RNA分子の転写によって発現を可能とするように調節配列に連結させる。種々の細胞型にてアンチセンスRNA分子の連続的発現を指令する、アンチセンス核酸と連結する調節配列を選択することができる；例えば、アンチセンスRNAの組織または細胞型特異的発現を指令するウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサー、または調節配列を選択することができる。

【0044】

本発明の組換え発現ベクターはまた、本発明の組換え分子で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を容易にするマーカー遺伝子を含むこともできる。マーカー遺伝子として、例えば、特定の薬物、
- ガラクトシダーゼ、クロルアンフェニコール
・ アセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼまたはイムノグロブリンあるいはイムノグロブリン、好ましくはIgGのFc部などのその一部に対して耐性を付与する、G418およびヒグロマイシンなどの蛋白をコードする遺伝子が挙げられる。そのマーカーは目的とする核酸と異なるベクターに導入することができる。

10

【0045】

組換え発現ベクターはまた、組換え蛋白の発現を増加させ、組換え蛋白の溶解性を増加させ；およびアフィニティー精製にてリガンドとして作用することにより標的組換え蛋白の精製を助成する、融合部分をコードする遺伝子を含むいてもよい。例えば、蛋白溶解切断部位を標的組換え蛋白に加え、その組換え蛋白を融合蛋白部分から分離し、つづいて融合蛋白を精製してもよい。典型的な融合発現ベクターは、各々、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合蛋白または蛋白Aと融合し、組換え蛋白となる、pGEX(Amrad Corp., Melbourne, Australia)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, NJ)を包含する。

20

【0046】

組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、形質転換宿主細胞を産生することができる。「形質転換宿主細胞」は本発明の組換え発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を包含する。「形質転換された」、「トランスフェクトされた」、「トランスフォーメーション」および「トランスフェクション」なる語は、多くの標準的方法のうちの一つ方法で核酸(例えば、ベクター)を細胞に導入することを包含する。原核細胞を、例えば、エレクトロポレーションまたは塩化カルシウム介在トランスフォーメーションにより、核酸で形質転換させることができる。核酸はリン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈降法、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、リポフェクシン、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションなどの慣用的技法を介して哺乳動物細胞に導入することができる。宿主細胞を形質転換およびトランスフェクトする適当な方法は、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989))および他のラボラトリーテキストブックに見ることができる。

30

【0047】

適当な宿主細胞は多種の原核生物および真核生物宿主細胞を包含する。例えば、本発明の蛋白は、イー・コリなどの細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルスを用いる)、酵母細胞または哺乳動物細胞にて発現させることができる。他の適当な宿主細胞は、Goeddel, gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991)に見ることができる。

40

挿入された核酸配列の発現を調節し、所望の方法にて蛋白を修飾(例えば、糖鎖形成またはリン酸化)および処理(例えば、切断)する宿主細胞を選択することもできる。蛋白の翻訳後処理および修飾の特異的かつ特徴的な機構を有する宿主系または細胞系を選択することもできる。例えば、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、29

50

3、3 T 3 および W I 3 8 を含む真核生物の宿主細胞を用いることもできる。長期にわたって、蛋白を高収率で安定して発現させるために、細胞系および宿主系を遺伝子操作し、遺伝子産物を安定して発現させてもよい。

【0048】

宿主細胞、およびとりわけ本明細書に記載の方法を用いて産生される細胞系は、K L K 1 5 関連蛋白の活性を調節する化合物をスクリーニングし、評価するのに特に有用である。本発明の蛋白はまた、限定するものではないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、マイクロピッグ (micro-pig)、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ヒト以外の霊長類 (例えば、ヒヒ、サルおよびチンパンジー) を含む、ヒト以外のトランスジェニック動物にて発現させることもできる [Hammer ら (Nature 315: 680 - 683, 1985)、Palmiter ら (Science 222: 809 - 814, 1983)、Brinster ら (Proc Natl. Acad. Sci USA 82: 4438 - 4442, 1985)、Palmiter および Brinster (Cell 41: 343 - 345, 1985) および米国特許第 4736866 号を参照のこと]。当該分野にて知られている方法を用いて K L K 1 5 関連蛋白をコードする本発明の核酸分子を動物に導入し、トランスジェニック動物の創始細胞系を産生してもよい。かかる操作は前核マイクロインジェクション、レトロウイルス介在遺伝子の生殖細胞系への移動、真核細胞幹細胞における遺伝子標的操作、胚のエレクトロポレーションおよび精子介在遺伝子移動を包含する。

10

【0049】

本発明はそのすべての細胞中に K L K 1 5 遺伝子を有するトランスジェニック動物、およびすべてではないがいくつかの細胞にて導入遺伝子を有する動物を意図するものである。導入遺伝子は単一の導入遺伝子としてまたはコンカテマーにて組み込むことができる。導入遺伝子は選択的に導入され、特定の細胞型を活性化させることができる (例えば、Lasko ら、1992 Proc. natl. Acad. Sci. USA 89: 6236 を参照のこと)。導入遺伝子は遺伝子標的操作により内因的遺伝子の染色体部位に組み込むことができる。導入遺伝子を特定の細胞型に導入し、その細胞型での内因的遺伝子を不活性化させてもよい (Gu ら、Science 265: 103 - 106 を参照のこと)。

20

トランスジェニック動物での組換え K L K 1 5 関連蛋白の発現を標準的技法を用いて検定する。最初のスクリーニングをサザンブロット分析により行うか、または P C R 法により行い、導入遺伝子が組み込まれているかどうかを解析する。トランスジェニック動物の組織中の m R N A 発現のレベルをまた、組織サンプルのノーザンブロット解析、イン・サイチュ・ハイブリダイゼーションおよび R T - P C R を含む、方法を用いて評価する。組織はまた、K L K 1 5 蛋白に拮抗する抗体を用いて免疫細胞化学的に評価することもできる。

30

【0050】

本発明の蛋白はまた、固相合成などの蛋白の化学にて周知の技法を用いる化学合成 (Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149 - 2154) または均質溶液合成 (Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, E. Wansch 編, Vol. 15 I および II, Thieme, Stuttgart) により調製することができる。

40

蛋白などの他の分子と接合した本発明の K L K 1 5 関連蛋白を含む N - 末端または C - 末端融合蛋白は、組換え技法を介して、K L K 関連蛋白の N - 末端または C - 末端を、所望の生物学的機能を有する選択された蛋白またはマーカー蛋白の配列と融合させることにより調製することができる。得られた融合蛋白は本明細書に記載の選択された蛋白またはマーカー蛋白と融合した K L K 1 5 蛋白を含有する。融合蛋白を調製するのに用いることができる蛋白として、例えば、イムノグロブリン、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST)、ヘマグルチニン (HA) およびランケートされた myc が挙げられる。

【0051】

50

3. 抗体

本発明の K L K 1 5 関連蛋白を用いて該蛋白に特異的な抗体を調製することができる。該蛋白の非保存領域にある別個のエピトープに結合する抗体を調製することができる。この蛋白の非保存領域は他の蛋白に対して実質的な配列相同性を有しないものである。十分に特徴付けられたドメインなどの保存領域から由来の領域を用いて K L K 1 5 関連蛋白の保存領域に対する抗体を調製することもできる。K L K 1 5 関連蛋白に対して特異性を有する抗体はまた、本明細書に記載されるように細菌にて融合蛋白を発現させることにより生成された融合蛋白から産生することもできる。

本発明は、無傷のモノクローナルまたはポリクローナル抗体、および免疫学的に活性なフラグメント（例えば、F a b、(F a b)₂フラグメントまたはF a b発現ライブラリーフラグメントおよびそのエピトープ結合フラグメント）、抗体重鎖および抗体軽鎖、遺伝子操作された一本鎖F v分子（L a d n e rら、米国特許第4946778号）、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、例えば、ヒト起源である部分を残しているが、ネズミ抗体の結合特異性を含有する抗体を用いることができる。モノクローナルおよびポリクローナル抗体、フラグメントおよびキメラを含む抗体は、当業者に公知の方法を用いて調製することができる。

10

【0052】

4. 本発明の核酸分子、K L K 1 5 関連蛋白および抗体の適用

本発明の核酸分子、K L K 関連蛋白および抗体は、K L K 1 5 関連蛋白に係する障害（例えば、癌または甲状腺障害）の予後および診断評価に、およびかかる障害の素因のある対象を同定するのに用いることができる（セクション4.1.1および4.1.2）。本発明の具体例においては、患者において、癌マーカーであるK L K 1 5の発現を検出する方法であって；

20

（a）患者から由来のサンプルを採取し；

（b）そのサンプル中の、K L K 1 5をコードする核酸配列またはK L K 1 5核酸配列によりコードされる蛋白産物を検出する

ことを含む方法が提供される。

本発明の具体例において、本発明の核酸分子、K L K 関連蛋白および抗体は、癌、特に前立腺癌の診断およびステージングに用いることができる。K L K 1 5 関連蛋白が高レベルにあることは、前立腺癌のより悪性の形態と関連しており、予後不良の徴候因子とすることができる。

30

【0053】

K L K 1 5 関連蛋白およびK L K 1 5 関連蛋白をコードする核酸分子を検出することによる、本発明の核酸分子およびK L K 1 5 関連蛋白の検出方法を用いてK L K 1 5 関連蛋白と関与する障害をモニターすることができる。本発明はまた、K L K 1 5 関連蛋白の生物学的活性を調節する化合物を同定する方法（セクション4.2）を包含する。これらの化合物、抗体などは、K L K 1 5 関連蛋白が関与する障害の治療に用いることができる（セクション4.3）。本明細書に記載の方法を用いてK L K 1 5 関連蛋白の発現の発生について研究することができ、したがって、K L K 1 5 関連蛋白の役割についてさらなる見解が得られるであろう。

40

【0054】

4.1 診断方法

K L K 1 5 関連蛋白が関与する障害を診断および予後評価するのに、およびかかる障害の素因のある対象を同定するのに、種々の方法を利用することができる。かかる方法は、例えば、本発明の核酸分子、そのフラグメントおよびK L K 1 5 関連蛋白に拮抗する、ペプチドフラグメントを含む、抗体を利用するものであってもよい。特に、例えば：（1）K L K 1 5 変異の存在の検出、または非障害状態と関連するK L K 1 5 m R N Aの発現過剰または発現不足の検出、あるいは特定の症状またはかかる症状に対する感受性と相関関係にある可変スプライシング形態のK L K 1 5 転写物の定性または定量的検出；および（2）非障害状態と関連するK L K 1 5 関連蛋白が過多または不足しているかの検出、あるい

50

は障害または障害に向かう進行と相関している修飾（例えば、全長よりも短い）K L K 1 5 蛋白の存在の検出のために、該核酸および抗体を用いることができる。

【0055】

本明細書に記載の方法を用いて、例えば、宿主から新たに取り出された一群の細胞中の、悪性細胞または前癌状態細胞の存在の可能性を評価することができる。かかる方法を用いて腫瘍を検出し、その増殖を定量し、疾患の診断および予後を補助することができる。該方法を用いて癌転移の存在を検出することができ、ならびに手術、癌化学療法および/または放射線療法の後にすべての腫瘍組織が存在しないことまたは除去されていることを確認することができる。さらにそれらの方法を用いて、癌化学療法および腫瘍の再発をモニター観察することもできる。

10

本明細書に記載の方法は、本明細書に記載の、例えば、臨床条件にて汎用することができる、少なくとも1つの特異的K L K 1 5 核酸または抗体を含む、予めパックされている診断キットを使用し、患者をスクリーンかつ診断し、障害の発病の素因を示す個体をスクリーンかつ同定することにより行うことができる。

【0056】

核酸を基礎とする検出方法を以下のセクション4.1.1に記載する。ペプチド検出方法を以下のセクション4.1.2に記載する。本発明の方法を用いて分析することができる試料は、K L K 1 5を発現することがわかっているかまたはK L K 1 5を発現すると思われるもの、あるいはK L K 1 5 関連蛋白を含有するものを包含する。試料は患者または細胞培養基から由来するものであってもよく、限定されるものではないが、生体液、組織抽出物、新たに収穫した細胞および培地にてインキュベートした細胞の溶菌液を包含する。本発明のいずれかの核酸分子から由来のオリゴヌクレオチドまたはさらに長いフラグメントをマイクロアレイにて標的として用いることができる。そのマイクロアレイを用いて多数の遺伝子の発現レベルを同時にモニターし、遺伝的変種、変異および多形性を同定することができる。そのマイクロアレイから由来の情報をを用いて遺伝子機能を調べ、障害の遺伝的根拠を理解し、障害を診断し、治療剤の活性を開発かつモニターすることができる。マイクロアレイの調製、使用および分析は当業者に周知である。（例えば、Brennan, T. M. ら (1995) 米国特許第5474796号; Schena ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619; Baldeschweiler ら (1995) PCT 出願 WO 95/251116; Shalon, D. ら (1995) PCT 出願 WO 95/35505; Heller, R. A. ら (1997) Proc. Natl. Sci. 94:2150-2155; および Heller, M. J. ら (1997) 米国特許第5605662号を参照のこと。）

20

30

【0057】

4.1.1 本発明の核酸分子の検出方法

本発明の核酸分子により、当業者は試料中の核酸配列を検出するのに用いるためのヌクレオチドプローブを構築することができる。適当なプローブは、K L K 1 5 蛋白の領域からの少なくとも5個の連続したアミノ酸をコードする核酸配列に基づく核酸分子を含む。それらは15ないし30個のヌクレオチド（配列番号47-50を参照のこと）を含むことが好ましい。ヌクレオチドプローブは、適当なシグナルを提供し、³²P、³H、¹⁴Cなどの十分な半減期を有する放射性活性な標識などの検出可能な物質で標識することができる。使用することができる他の検出可能な物質は、特異的に標識可能な抗体により認識される抗原、蛍光化合物、酵素、標識された抗原に特異的な抗体および発光化合物を包含する。プローブと検出されるヌクレオチドとのハイブリダイゼーションおよび結合速度ならびにハイブリダイゼーションについて利用可能なヌクレオチドの量と関連する適当な標識を選択することができる。標識されたプローブを、サンプルから、1989、Molecular Cloning、A Laboratory Manual（第2版）に概説されるように、ニトロセルロースフィルターまたはナイロン膜などの固体支持体上にある核酸とハイブリッド形成させることができる。核酸プローブを用いて、K L K 1 5 関連蛋白をコードする、好ましくはヒト細胞中の遺伝子を検出することもできる。ヌクレオチ

40

50

ドプローブもまた、K L K 関連蛋白の関連する障害を診断するにおいて；かかる障害の進行をモニター観察するにおいて；または治療的処置をモニター観察するにおいて有用である。

【0058】

ハイブリダイゼーション技法においてプローブを用い、K L K 15 関連蛋白をコードする遺伝子を検出することもできる。該技法は、一般に、患者または他の細胞源からの試料より得られた核酸（例えば、組換えDNA分子、クローン化遺伝子）を、プローブの核酸の相補的配列に対する特異的アニーリングに好ましい条件下で、本発明のプローブと接触させてインキュベートすることを包含する。インキュベーションの後、アニールされていない核酸を除去し、もしあれば該プローブとハイブリダイズした核酸の存在を検出する。本発明の核酸分子の検出は、PCRなどの増幅方法を用いて特異的遺伝子配列を増幅し、つづいて当業者に公知の技法を用いて増幅された分子を分析することを包含する。適当なプライマーは当業者であれば慣用的に設計することができる。

10

【0059】

ゲノムDNAを生体試料のハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイにおいて用い、点突然変異、挿入、欠失および染色体転位を含む、K L K 15 構造に關与する異常を検出してもよい。例えば、直接的配列決定、一本鎖配座多形性分析、ヘテロ二本鎖分析、変性勾配ゲル電気泳動、化学的不对合切断、およびオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを利用することができる。

当該分野にて公知の遺伝子型技法を用いて、k l k 15 遺伝子の変異と密接に關係している多型性を分類することができる。その多型性を用いて、変異を担持する可能性のあるファミリーの個体を同定することができる。多型性がK L K 遺伝子の変異の連鎖不均衡を示す場合、それを用いて変異のある可能性のある一般的集団の個体をスクリーンすることもできる。用いることができる多型性は、制限フラグメント長多型性（R E L P s）、単塩基多型性および単純配列反復多型性（S S L P s）を包含する。

20

【0060】

本発明のプローブを用いてR F L P sを直接同定してもよい。本発明のプローブまたはプライマーを付加的に使用して、Y A C s、B A C s、P A C s、コスミド、ファージまたはプラスミドを単離することができる。クローンのDNAをハイブリダイゼーションまたは配列決定操作を用いてS S L P sについてスクリーンすることができる。

30

本明細書に記載のハイブリダイゼーションおよび増幅技法を用いてk l k 15 発現の定性的および定量的態様を検定してもよい。例えば、k l k 15 を発現することがわかっている細胞型または組織からRNAを単離し、本明細書にて言及するハイブリダイゼーション（例えば、標準的ノーザン分析）またはPCR技法を利用して試験してもよい。該技法を用い、正常なまたは異常な可変スプライシングによる可能性のある、転写サイズの違いを検出することもできる。該技法を用いて全長のレベルおよび/またはK L K 15 関連蛋白と関連する障害の徴候を示す個体に關連する正常な個体にて検出される可変スプライシング転写物のレベルの間の定量的違いを検出することができる。

プライマーおよびプローブを、生検から得られた患者の（固定および/または凍結させた）組織断面上、イン・サイチュにて、すなわち、直接的に、上記した方法にて、あるいは切除術にて用いることもできる。

40

【0061】

4.1.2 K L K 15 関連蛋白を検出する方法

K L K 15 関連蛋白と特異的に反応する抗体、あるいは酵素接合体などの誘導体または標識誘導体を用いて種々な試料（例えば、生体物質）中のK L K 15 関連蛋白を検出することができる。それらを診断または予後試薬として用いてもよく、かつそれらをK L K 15 関連蛋白発現のレベルの異常性、またはK L K 15 関連蛋白の構造における、および/または時間的、組織的、細胞的または亜細胞的位置における異常を検出するのに用いてもよい。さらに抗体を用いてインビトロにて治療用化合物の可能性のある化合物をスクリーニングし、K L K 15 関連蛋白に關連する障害および他の状態に対するその効果を測定する

50

こともできる。また、インビトロイムノアッセイを用いて特定の療法の効能を評価またはモニターすることもできる。さらに本発明の抗体をインビトロにて用い、K L K 1 5 関連蛋白を産生するように遺伝子操作した細胞におけるK L K 1 5 発現のレベルを測定することもできる。

【0062】

抗体は、K L K 1 5 関連蛋白の抗原決定因子と抗体の間の結合相互作用に応じて、いずれか既知のイムノアッセイにて用いることができる。かかるアッセイの一例が、放射性免疫検定法、酵素免疫検定法（例えば、E L I S A）、免疫蛍光法、免疫沈降法、ラテックス凝集反応、赤血球凝集反応および組織化学試験である。特定の細胞事象または病的症状における役割を測定し、かかる病的症状を診断し、かつ治療するために、抗体を用いて試料中のK L K 1 5 関連蛋白を検出および定量することができる。

10

特に、本発明の抗体を、例えば、細胞および細胞以下レベルで、免疫-組織化学的分析に使用し、K L K 1 5 関連蛋白を検出し、それを特定の細胞または組織に、および特定の細胞以下の配置に位置付け、そして発現のレベルを定量することができる。

【0063】

光学および電子顕微鏡を用いて抗体を位置付ける当該分野に公知の細胞化学技法を用いてK L K 1 5 関連蛋白を検出してもよい。一般に、本発明の抗体を検出可能な物質で標識し、その検出可能な物質の存在に基づいて、K L K 1 5 関連蛋白を組織および細胞にて位置付けることができる。検出可能な物質の一例として、限定されるものではないが、以下の物質：放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）；蛍光標識（例えば、F I T C、ローダミン、ランタニド蛍光体）；ルミノールなどの発光標識；酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ）；ビオチニル基（標識されたアビジン、例えば、光学または熱量測定法により検出することができる蛍光標識または酵素活性を含有するストレプトアビジンにより検出され得る基）；第2受容体により認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、第2抗体用の結合部位、金属結合領域、エピトープタグ）が挙げられる。ある場合には、標識を種々の長さのスペーサーアームを介して結合させ、立体障害の強さを減少させる。また、抗体を、電子顕微鏡で容易に可視化される、フェリチンまたはコロイド状金などの、高電子密度物質にカップリングさせることもできる。

20

30

【0064】

抗体または試料を、細胞、抗体などの固定能を有する、担体または固体支持体上に固定してもよい。例えば、担体または支持体は、ニトロセルロースまたはガラス、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、磁鉄鉱とすることができる。支持体は、球面（例えば、ビーズ）、円筒面（例えば、試験管またはウェルの内面、あるいはロッドの外面）あるいは平面を含む、どのような構成を有していてもよい。K L K 1 5 関連蛋白と反応する抗体に特異的な第2抗体を導入することにより、一次的抗原-抗体反応を増幅するところの、間接的な方法を利用することもできる。一例として、K L K 1 5 関連蛋白との特異性を有する抗体がウサギIgG抗体であるならば、第2抗体は本明細書に記載されるような検出可能な物質で標識されたヤギ抗-ウサギ-グロブリンとすることができる。

40

検出可能な物質として放射性活性な標識を用いる場合、K L K 1 5 関連蛋白はラジオオートグラフィーにより位置付けることができる。種々の光学的方法により、または粒子を計数することによって、ラジオオートグラフにおける粒子の密度を測定することで、ラジオオートグラフィーの結果を定量することができる。

【0065】

一の実施例において、本発明は、個体における癌（例えば、前立腺癌）の進行をモニター観察する方法であって、

（a）K L K 1 5 関連蛋白に結合する一定量の抗体と、個体から由来の試料とを接触させ、試料中に抗体とK L K 1 5 関連蛋白とを含む二元複合体を形成させ；

（b）試料中での複合体の形成の存在またはその量を測定または検出し；

50

(c) その後、適切な時点で、工程(a)および(b)を繰返し；
(d) 工程(b)の結果と、工程(c)の結果を比較する、ここで複合体の形成量の違いはその個体における癌の進行を意味する、
ことを含む方法を意図する。

複合体の量を、癌(例えば、前立腺癌)の危険のない、あるいは癌を患っている個体からの複合体の量の代表的な値と比較することもできる。

【0066】

4.2 物質/化合物を同定または評価する方法

本明細書に記載の方法は、KLK15関連蛋白に結合するか、またはKLK15関連蛋白と相互作用する他の蛋白に、KLK15関連蛋白とKLK15関連蛋白もしくはKLK15関連蛋白と相互作用する他の蛋白に結合する物質の間の相互作用を干渉し、または強化する化合物に結合する物質を含む、KLK15関連蛋白の生物学的活性を調節する物質を同定するように設計される。

本発明の方法を用いて同定される物質および化合物は、限定されるものではないが、Ig-尾部融合ペプチドを含む可溶性ペプチド、ランダムペプチドライブラリーのメンバーおよびD-および/またはL-配置アミノ酸でできているコンビナトリアルケミストリー誘導の分子ライブラリー、ホスホペプチド(ランダムにまたは部分的に縮重して方向付けられるホスホペプチドライブラリーのメンバーを包含する)、抗体[例えば、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗-イディオタイプ、キメラ、一本鎖抗体、フラグメント(例えば、Fab、F(ab)₂ならびにそのFab発現ライブラリーフラグメントおよびエピトープ結合フラグメント)]および小型有機または無機分子などのペプチドを包含する。この物質または化合物は内因的な生理学的化合物であってもよく、あるいは天然または合成化合物であってもよい。

【0067】

KLK関連蛋白を調節する物質は、そのKLK15関連蛋白との結合能に基づいて同定することができる。したがって、本発明はまた、KLK15関連蛋白に結合する物質を同定する方法を提供する。本発明の方法を用いて同定される物質は、慣用的操作により単離され、クローンされ、かつ配列決定され得る。本発明のポリペプチドと結合する物質は、本発明のポリペプチドの生物学的または免疫学的活性のアゴニストまたはアンタゴニストであってもよい。

「アゴニスト」なる語は、蛋白の活性の量を増加させるか、またはその期間を長くする分子をいう。「アンタゴニスト」なる語は、蛋白の生物学的または免疫学的活性を減少させる分子をいう。アゴニストまたはアンタゴニストは、蛋白、核酸、炭水化物または本発明の蛋白と結合するいずれか他の分子を包含する。

【0068】

KLK関連蛋白と結合しうる物質は、KLK15関連蛋白を、物質-KLK15関連蛋白の複合体の形成を可能とする条件下で、KLK15関連蛋白と結合する可能性のある試験物質と反応させ、その複合体を除去および/または検出することにより同定することができる。該複合体は、物質-KLK関連蛋白複合体について、遊離物質について、または複合化していないKLK関連蛋白について検定することにより検出することができる。物質-KLK15関連蛋白の複合体の形成を可能とする条件は、物質および蛋白の特性および量などの因子を考慮して選択することができる。

物質-蛋白の複合体、遊離物質または複合化されていない蛋白は、慣用的な単離技法、例えば、塩析、クロマトグラフィー、電気泳動、ゲル濾過、分画、吸着、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、凝集またはそれらの組み合わせにより単離することができる。その成分の検定を容易にするために、KLK15関連蛋白または物質に対する抗体、標識されたKLK15関連蛋白、または標識された物質を利用することもできる。抗体、蛋白または物質を上記したように検出可能な物質で標識してもよい。

【0069】

本発明の方法に用いられるKLK15関連蛋白または物質は不溶化させることができる。

例えば、K L K 1 5 関連蛋白または物質を、アガロース、セルロース、デキストリン、セファデックス、セファロース、カルボキシメチルセルロースポリスチレン、濾紙、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ガラスビーズ、ポリアミン・メチルビニル・エーテル・マレイン酸コポリマー、アミノ酸コポリマー、エチレン・マレイン酸コポリマー、ナイロン、絹などの適当な担体に結合させてもよい。担体は、例えば、チューブ、試験板、ビーズ、ディスク、球体などの形態とすることができる。既知の化学的または物理的方法、例えば、臭化シアンカップリング法を用いて、その材料を適当な不溶性担体と反応させることにより、不溶化蛋白または物質を調製してもよい。

【0070】

本発明はまた、K L K 1 5 関連蛋白と、K L K 1 5 関連蛋白と結合する物質との結合のアゴニストまたはアンタゴニスト（すなわち、エンハンサーまたはインヒビター）について検定することにより、化合物を本発明のK L K 1 5 関連蛋白の生物学的活性を調節するその能力について評価する方法を提供する。化合物がK L K 1 5 関連蛋白と該蛋白に結合する物質との結合のアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを評価するための基本的な方法は、物質 - K L K 1 5 関連蛋白の複合体を形成させる条件下、試験化合物の存在の下、K L K 1 5 関連蛋白と該物質を含有する反応混合物を調製することである。試験化合物を最初に添加してもよく、あるいはK L K 1 5 関連蛋白と物質の添加の後に加えてもよい。試験化合物を含まない、またはプラセボを含む対照となる反応混合物もまた調製する。複合体の形成を検出し、反応混合物中ではなく、対照反応物中での複合体の形成は、試験化合物がK L K 1 5 関連蛋白と物質との相互作用を干渉していることを示す。反応は液相にて行ってもよく、あるいはK L K 1 5 関連蛋白、物質または試験化合物を本明細書に記載するように固定してもよい。化合物が本発明のK L K 1 5 関連蛋白の生物学的活性を調節するその能力は、細胞における生物学的作用を測定することにより試験することができる。

10

20

【0071】

アゴニストおよびアンタゴニスト、すなわち、本発明の方法を用いて検定することができるインヒビターおよびエンハンサーは、アゴニスト結合部位、競合アンタゴニスト結合部位、非競合アンタゴニスト結合部位またはアロステリック部位を含め、蛋白または物質上の1またはそれ以上の結合部位で作用することができる。

本発明はまた、K L K 1 5 関連蛋白とK L K 1 5 関連蛋白に結合する能力を有する物質との相互作用のアゴニストの効果を阻害するアンタゴニストについてスクリーニングすることも可能とする。かくして、本発明を用いてK L K 1 5 関連蛋白の同じ結合部位と競合する化合物について検定することができる。

30

本発明はまた、K L K 1 5 関連蛋白と相互作用する蛋白に結合する化合物を同定する方法を提供する。蛋白 - 蛋白の相互作用は、同時免疫沈降法、交差結合法および勾配またはクロマトグラフィーカラムを介する同時精製法などの慣用的操作を用いて同定することができる。K L K 1 5 関連蛋白と相互作用する蛋白をコードする遺伝子を同時に同定する方法を利用することもできる。これらの方法は標識されたK L K 1 5 関連蛋白で発現ライブラリーをプローブすることを含む。

【0072】

インビボにおける蛋白の相互作用を検出するのに二ハイブリッドシステムを用いることもできる。二ハイブリッド蛋白をコードするプラスミドを構築するのが一般である。第1のハイブリッド蛋白はK L K 1 5 関連蛋白に融合する転写アクチベーター蛋白のDNA結合ドメインからなり、第2のハイブリッド蛋白はcDNAライブラリーの一部としてプラスミドに組み換えられるcDNAによってコードされる未知の蛋白に融合する転写アクチベーター蛋白のアクチベータードメインからなる。プラスミドを、その調節領域が転写アクチベーターの結合部位を含有する、レポーター遺伝子（例えば、lacZ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）を含有する一の菌株の酵母（例えば、エス・セレピシエ）に形質転換させる。そのハイブリッド蛋白単独ではレポーター遺伝子の転写を活性化することができない。しかしながら、二ハイブリッド蛋白の

40

50

相互作用は機能的アクチベーター蛋白を再構築し、レポーター遺伝子の産物について検定することにより検出される、レポーター遺伝子の発現をもたらす。

【0073】

融合蛋白を上記した方法に用いることもできる。特に、グルタチオン - S - トランスフェラーゼに融合した K L K 1 5 関連蛋白を該方法にて用いることができる。

本発明の K L K 1 5 関連蛋白のモジュレーターもまた、蛋白の触媒活性を阻害または亢進するその能力に基づいて同定することができる。

本発明の方法を用いて K L K 1 5 関連蛋白を調節する化合物を評価するのに適する試薬を、必要不可欠な材料が適当な容器に詰め込まれている、使い易いキットに充填してもよい。

10

【0074】

4.3 組成物および治療

本発明の蛋白、本明細書に記載の方法により同定される物質または化合物、本発明の抗体および核酸分子は、K L K 1 5 関連蛋白の生物学的活性を調節するために用いてもよく、患者における癌（特に、甲状腺、前立腺、結腸、腎臓、精巣癌）および甲状腺障害などの症状の治療に用いることができる。

したがって、該物質、抗体、ペプチドおよび化合物は、インビボでの投与に適する生物学的に適合する形態にて対象に投与する医薬組成物に処方してもよい。「インビボでの投与に適する生物学的に適合する形態」とは、治療作用がいずれの毒性作用をも上回るものの、投与される活性物質の形態を意味する。活性物質は、ヒトおよび動物を含む、生物に投与することができる。本発明の医薬組成物を投与する治療的に活性な量とは、所望の結果を得るのに必要な用量および期間の効果的な量として定義される。例えば、物質の治療的に活性な量は、個体の病態、年齢、性別および体重などの因子、および個体において所望の応答を惹起する抗体の能力によって変化する。最適な治療応答を付与するように投与計画を調節してもよい。例えば、一日に数回に分割した用量を投与してもよく、あるいは治療状況の緊急性による指標に比例してその用量を減少させることもできる。

20

【0075】

活性物質を注射（皮下、静脈内等）、経口投与、吸入、経皮投与、または経直腸投与などの一般的方法により投与してもよい。投与経路に応じて、物質を不活性化しうる、酵素、酸および他の天然条件の作用から該物質を保護するために一の材料で該物質を被覆してもよい。

30

本明細書に記載の組成物は、有効量の活性物質を医薬上許容されるビヒクルと混合して組み合わせる、対象に投与することができる医薬上許容される組成物を調製する自体公知の方法により調製することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Science (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985) に、適当なビヒクルが記載されている。この記載に基づいて、組成物は、たとえ排他的でないとしても、適当な pH で、生理学的流体の等浸透性の緩衝溶液に含有させた、1 またはそれ以上の医薬上許容されるビヒクルまたは希釈体と組み合わせた活性物質の溶液を包含する。

40

【0076】

該組成物は、単独で、あるいは他の治療薬または他の治療形態（例えば、化学療法または放射線療法）と組み合わせ、治療薬として適用される。例えば、該組成物は抗増殖薬、抗菌薬、免疫刺激剤または抗炎症剤と組み合わせて用いることができる。特に、該化合物は抗ウイルスおよび/または抗増殖薬と組み合わせて用いることができる。本発明の組成物は、他の治療薬または療法と同時に、別々に、または逐次的に投与することができる。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスまたはワクシニアウイルスから、あるいは種々の細菌プラスミドから由来のベクターを用いて核酸分子を標的とする器官または細胞集団にデリバリーすることができる。当業者に周知の方法を用い、本発明のアンチセンス核酸分子を発現するであろう組換えベクターを構築することもできる（例えば、Sambrook

50

ookら(前掲)およびAusubelら(前掲)を参照のこと)。

【0077】

全長のcDNA配列および/またはその調節因子を含む核酸分子は、当業者が遺伝子の機能のセンス(Yousoufian HおよびHFLodish 1993 Mol Cell Biol 13:98-104)またはアンチセンス(Eguchiら(1991) Annu Rev Biochem 60:631-652)調節における調査手段として本発明の蛋白をコードする配列を用いることができるようにする。かかる技法は当該分野にて周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴマーあるいはさらに長いフラグメントをコーディングまたは対照領域に沿った種々のロケーションから設計することができる。

本発明の蛋白をコードする遺伝子は、細胞または組織を、高レベルの所望のKLK15-コード化フラグメントを発現する、ベクターでトランスフェクトすることによりターンオフされ得る。かかる構築物は細胞を翻訳され得ないセンスまたはアンチセンス配列で一杯にすることができる。DNAへの組み込みのない場合であっても、すべてのコピーが内因的ヌクレアーゼにより無効とされるまで、かかるベクターはRNA分子を転写し続ける。

【0078】

遺伝子発現の修飾は、本発明の蛋白をコードする遺伝子の調節領域に、すなわち、プロモーター、エンハンサーおよびイントロンに、アンチセンス分子、DNA、RNAまたはPNAを設計することにより得ることができる。オリゴヌクレオチドは、転写開始部位、例えば、リーダー配列の-10と+10領域の間から誘導されることが好ましい。アンチセンス分子が転写物とリボソームとの結合を妨げることによりmRNAの翻訳を遮断するように、該分子を設計することもできる。阻害は「三重螺旋」塩基対合方法を用いてもなされ得る。三重螺旋対合は二重螺旋の、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子との結合のために十分に切断する能力を傷つける。三重螺旋DNAを用いる治療的進歩は、Geel Eら(In:Huber B EおよびB I Carr(1994) Molecular and Immunologic Approaches, Future Publishing Co., Mt Kisco N.Y.)により報告されている。

【0079】

リボザイムはRNAの特異的切断を触媒する酵素性RNA分子である。リボザイムはリボザイム分子が相補的標的RNAに配列特異的にハイブリダイズし、つづいて内ヌクレオチド結合分解性切断に供するように作用する。したがって、本発明は、本発明の蛋白をコードする配列の内ヌクレオチド結合分解性切断を特異的かつ十分に触媒し得る、遺伝子操作されたハンマーヘッド型モチーフリボザイム分子をも提供する。

以下の配列、GUA、GUUおよびGUCを含む、リボザイム切断部位について標的分子をスキャンすることにより、まず、潜在的RNA標的内にある特異的リボザイム切断部位を同定することができる。その部位が同定されれば、切断部位を含有する標的遺伝子の領域に対応する、15と20個の間のリボヌクレオチドショートRNA配列を、オリゴヌクレオチドを作動不能にする、第2の構造的特徴について評価することができる。リボヌクレオチド保護検定法を用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対するアクセス性を試験することにより、候補標的の適性を決定することもできる。

【0080】

ベクターを細胞または組織に導入する方法は、本明細書に開示されており、インビボ、インビトロおよびエクスピボ療法に適する、方法を包含する。エクスピボ療法の場合、ベクターを患者から得られた幹細胞に導入し、自己移植片をその同一患者内でクローン操作により増殖させる(米国特許第5399493号および第5437994号を参照のこと)。形質導入による、またリボソームによるデリバリーは当該分野にて周知である。

KLK関連蛋白に対する抗体を、化学療法薬、トキシン、免疫学的応答修飾剤、造血剤、酵素および放射性同位元素と結合させて、癌(例えば、甲状腺、前立腺、結腸、腎臓、精巣癌)の予防および治療に用いることができる。例えば、KLK15関連蛋白に対する抗体を、限定されるものではないが、リシンA、ジフテリアトキシン、アブリン、モデシン

10

20

30

40

50

、またはシュードモナスまたはシゲラから由来の細菌性トキシンを含む、トキシン部分に結合させてもよい。トキシンおよびその誘導体は、特異的に標的された細胞毒性を得るために、癌または腫瘍細胞などの特定の標的組織に特異的な抗体と結合体を形成すると報告されている (Moolten F. L.ら、Immun. Rev. 62: 47-72、1982; および Bernhard, M. I. Cancer Res. 43: 4420、1983)。

【0081】

結合体は、当該分野にて知られている標準的手段により調製され得る。多くの二機能性連結剤 (例えば、ヘテロ二機能性リンカー、例えば、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート) が、Pierce Chemically Company 10、Rockford、Illから市販されている。

治療的使用のための抗体またはイムノトキシンの投与は、腹腔内、経口または経皮投与などの適当な処方での投与経路を用いることもできるが、静脈内投与によるものであってもよい。

KLK15 関連蛋白は、当該分野にて既知の方法を用い、化学療法薬、トキシン、免疫学的応答修飾薬、酵素および放射性同位元素に結合させてもよい。

【0082】

本発明はまた、癌を予防するか、またはその重篤度を軽減するための免疫療法を提供する。対象における癌の臨床的徴候または症状は、対象の癌に対する免疫応答を刺激するため、患者に対する有益な効果を表す。免疫応答を刺激することは、免疫応答を誘発すること 20、あるいは本発明のワクチン調製物の投与に反応して免疫エフェクター細胞の活性を亢進することである。癌の予防は、例えば、遺伝的素因または発癌性物質に対する曝露により癌を発生しやすくさせた患者にて癌が発症するまでの時間を増加させることにより表すことができる。癌の重篤度の軽減は、腫瘍の大きさおよび成長速度の減少により表すことができる。

【0083】

ワクチンは、KLK 関連蛋白、それから誘導されるペプチド、または化学的に産生される合成ペプチド、あるいはこれらの分子の組み合わせ、またはその融合蛋白もしくはペプチドから誘導することができる。この蛋白、ペプチド等は、組換え操作により、あるいは生物学的に、腫瘍関連蛋白の1またはそれ以上のエピトープに対応する1またはそれ以上の 30 アミノ酸配列を含むように合成または調製することができる。腫瘍関連蛋白のエピトープは、ある場合には、天然に存する蛋白またはポリペプチドのアミノ酸配列の変形が抗原的であってもよく、癌に対して保護免疫性または抗腫瘍発生効果を付与しうる可能性を含むことが理解されよう。配列の変形は、限定するものではなく、アミノ酸置換、拡張、欠失、切断、挿入およびその組み合わせを包含し得る。かかる変形は本発明の範囲内にある; ただし、その変形を含有する蛋白は免疫原性であり、かかるポリペプチドに対する抗体は、ワクチンとして投与した場合に、保護免疫および/または抗腫瘍形成活性を付与するのに十分な程度まで天然に存在するKLK15 関連蛋白と交差反応する。

【0084】

蛋白、ペプチドなどは、当該分野にて公知の方法を用いて、免疫応答の誘発能を有するワクチンに組み込むことができる。蛋白、ペプチドなどの抗原性を亢進する方法は当該分野にて知られており、多重結合の構造物に組み込み、高免疫原蛋白担体、例えば、キーホール・リンペット・ヘモシアニン (KLH) またはジフテリアトキソイドに結合させ、免疫 40 応答のアジュバントまたは他のエンハンサーと組み合わせて投与することを含む。

ワクチンを、免疫学的に許容される希釈体および担体ならびに完全フロインドアジュバント、サポニン、アラムなどを含む、生理学的に許容される媒体と組み合わせてもよい。

さらに、本明細書に記載のKLK 関連蛋白に対する抗体の抗-イディオタイプ抗体もまた、ワクチンとして有用であり、同様に処方しうるということが認識されるであろう。

【0085】

本発明に係るワクチンの投与は、一般に、甲状腺、前立腺、結腸、腎臓および精巣癌を含 50

む、癌の予防または治療に用いることができる。

癌の予防および／または治療のための本発明に係るワクチンの投与は、癌の摘出手術の前後、癌の治療のための化学療法の前、および癌の治療のための放射線療法の前、およびそれらの組み合わせの前、およびそれらの組み合わせの後にて開始することができる。本発明に係る癌の免疫療法は、利用可能な他の治療法、例えば、手術、化学療法、放射線療法と比べて、関係する副作用は実質的に最小であるため、癌の予防および／または治療のための好ましい治療法であろう。このワクチンは、癌を患っていないが、癌を発病する危険性のある対象において癌を予防する可能性または能力を有する。

【0086】

本発明の蛋白、物質、化合物、抗体、核酸分子、薬物および組成物の活性は動物実験モデル系において確認することができる。細胞培養における標準的な医薬的操作により、あるいは例えば、 ED_{50} （集団の50%にて治療的に効果的な用量）または LD_{50} （集団の50%に致死的な用量）統計値を算定することによる実験用動物を用いることにより、治療的効果および毒性を測定することができる。治療指数は治療の毒性作用に対する用量比であり、 ED_{50} / LD_{50} 比として表すことができる。大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。

【0087】

4.4 他の用途

本明細書に開示されている核酸を、未だ開発されていない、分子生物学方法にて用いてもよい；ただし、その新規な方法は、限定するものではないが、三重遺伝的コードおよび特異的塩基対相互作用などの特性を含む、現在知られているヌクレオチド配列の特性に依存する。

本発明はまた、本発明のポリペプチドの機能を研究する方法を提供する。本発明の核酸分子または遺伝子の発現を欠く、またはその発現を部分的に欠く細胞、組織およびヒト以外の動物は、遺伝子にて特異的欠失または挿入変異を有する本発明の組換え発現ベクターを用いて開発することもできる。組換え発現ベクターを用い、相同的組換えにより内因的遺伝子を不活性化または改変してもよく、それにより不完全な細胞、組織または動物を創造することができる。

【0088】

無効対立遺伝子は、欠失変異により胚幹細胞などの細胞にて生成され得る。組換え遺伝子はまた、該遺伝子を不活性化する挿入変異を含有するように遺伝子操作してもよい。ついで、かかる構築物を、トランスフェクション、エレクトロポレーション、インジェクションなどの技法により胚幹細胞などの細胞に導入してもよい。ついで、完全な遺伝子を欠く細胞を、例えば、サザンブロット、ノーザンブロットにより同定し、あるいは本明細書に記載の方法を用いてコードされたポリペプチドの発現について検定することにより同定してもよい。ついで、かかる細胞を胚幹細胞に融合させ、本発明のポリペプチドを欠く、ヒト以外のトランスジェニックな動物を生成してもよい。その変異の生殖細胞系列伝達は、例えば、インビトロにて胚幹細胞を8分割細胞胚などの初期段階の胚と一緒にし；その得られた胚芽細胞を雌の受容者に移し；得られた凝集キメラ細胞の生殖細胞系列伝達を得ることにより達成される。かかる変異体の動物を用いて特異的な細胞集団、発育パターンおよび通常、遺伝子発現に依存するインビボ工程を限定することができる。

【0089】

かくして、本発明は、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物であって、そのすべての生殖細胞および体細胞がKLK15関連蛋白をコードする遺伝子を不活性化または改変する組換え発現ベクターを含有する動物を提供する。一の具体例において、本発明はそのすべての生殖細胞および体細胞がKLK15関連蛋白をコードし、KLK15関連蛋白と関係する病変をもたらす、遺伝子を不活性化または改変する組換え発現ベクターを含有するヒト以外の哺乳動物のトランスジェニック動物を提供する。さらには、本発明は、本発明のKLK15関連蛋白を発現せず、あるいはその発現を改変する（例えば、減少させる）ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を提供する。一の具体例において、本発明は、KL

10

20

30

40

50

K 1 5 関連蛋白と関係する病変をもたらす、本発明の K L K 1 5 関連蛋白を発現せず、あるいはその発現を減少させるヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を提供する。K L K 1 5 関連蛋白の病変は K L K 1 5 関連蛋白の同型接合または異型接合変異体について観察される表現型に言及する。

【0090】

ヒト以外のトランスジェニック動物は、限定されるものではないが、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、イヌ、ネコ、ヤギ、およびサル、好ましくはマウスを包含する。

本発明はまた、K L K 1 5 関連蛋白に付随する病変、好ましくは K L K 1 5 関連蛋白と関係する病変を軽減または阻害する薬物について試験するための実験システムを条件とする、ヒト以外のトランスジェニックな動物の検定システムであって、

10

(a) その薬物を本発明のヒト以外のトランスジェニックな動物に投与し；

(b) 該薬物が投与されていない工程 (a) のヒト以外のトランスジェニックな動物と比べて、そのヒト以外のトランスジェニックな動物における病変（例えば、K L K 1 5 関連蛋白と関係する病変）を軽減するかまたは阻害するかを測定する、ことを含む検定システムを提供する。

該薬物は本明細書に記載の癌などの症状の治療および予防に有用である。該薬物はまた、本明細書に記載の医薬組成物に配合することもできる。

【0091】

(実施例)

20

材料および方法

新たな遺伝子の同定

K L K 1 遺伝子 (セントロメア) から K L K 1 4 遺伝子 (テロメア) (7、8、11、12、27) に伸びるヒトカリクレイン遺伝子座のついで連続地図を構築した。この領域に及ぶ重複している細菌性人工染色体 (BAC) クローンは、種々の放射線標識した遺伝子特異的プローブを用いてヒト BAC ライブラリーをスクリーニングすることにより同定された。約 300 kb のゲノム配列の領域を以前に記載されている (11、27) 種々の技法を用いて確立した。EcoR1 制限分析を行うことで、Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) から入手した染色体 19q13 の EcoR1 制限地図に沿ってカリクレイン遺伝子座を配向させた。つぎに、より動原体的に広がる BAC クローン (BC781134) を同定した。このクローンからの線状ゲノム配列のコンティグは LLNL から入手可能である。まず、これらのコンティグ配列を用い、以前に記載される生物情報操作 (8、12) を使用して新規な遺伝子の存在を予測し、新規な推定セリンプロテアーゼを同定した。ついで以下に記載するように、組織を配列決定、EST データベースサーチ、PCR スクリーニングを含む、種々の方法に付して、その推定遺伝子の配列を確認した。

30

【0092】

発現配列タグ (EST) の調査

新しい推定遺伝子の予測エクソンを、National Center for Biotechnology Information web server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 上の BLASTN アルゴリズム (28) を用い、ヒト EST データベース (dbEST) に対する相同性の調査に付した。95% よりも大きな相同性を有するクローンを I. M. A. G. E. コンソーシアム (29) から Research Genetics Inc.、Huntsville、AL を通して入手した。このクローンを、別に記載されるように (30) 増殖させ、精製して、インサート - フランキングベクタープライマーを用いて自動配列決定装置で両方向から配列決定した。

40

【0093】

前立腺癌細胞系およびホルモン刺激実験

LNCaP 前立腺癌細胞系をアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) (R

50

ockville、MD)から獲得した。グルタミン(200ミリモル/L)、ウシインスリン(10mg/L)、ウシ胎児血清(10%)、抗体および抗かび剤を補足した、プラスチックフラスコのRPMI培地(Gibco BRL、Gaithersburg、MD)にて略集密に達するまで細胞を培養した。ついで、該細胞を24-ウェルの組織培養プレートにアリコートし、50%集密まで培養した。実験を行う24時間前に、培地を10%チャコール-ストリップ処理に付したウシ胎児血清を含有するフェノールレッド不含の培地に変更した。刺激実験の場合、100%エタノールに溶かした種々のステロイドホルモンを 10^{-8} Mの最終濃度で培地に添加した。100%エタノールで刺激した細胞を対照として包含する。細胞を24時間培養し、ついでmRNA抽出で収穫した。

【0094】

KLK15遺伝子についての逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)全RNAを、LNCaP細胞系から、あるいは前立腺組織からトリゾール(Trizol)試薬を用い、その製造業者の指示に従って抽出した。RNA濃度を分光光度法により測定した。2μgの全RNAをスーパースクリプト(登録商標)(SuperscriptTM)増幅系(Gibco BRL)を用いて第1鎖cDNAに逆転写した。最終容量は20μlであった。新規な遺伝子の推定されるゲノム構造およびEST配列(後記参照)から得られる組み合わせ情報に基づいて、2つの遺伝子特異的プライマーを設計し(KLK15-F1-配列番号47およびKLK15-R1-配列番号48)(表1)、1μlのcDNA、10mMトリス-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、200μM dNTP(デオキシヌクレオシド・トリホスフェート)、150ngのプライマーおよび2.5単位のホットスター(登録商標)(HotStarTM)DNAポリメラーゼ(Qiagen Inc.、Valencia、CA)を含有する反応混合物中、パーキン-エルマー9600サーマル・サイクラー上でPCRを行った。サイクリング条件はTag DNAポリメラーゼを活性化するのに95 で15分間であり、つづいて94 で30秒、64 で30秒、72 で1分間を35サイクルであって、最終の拡張工程は72 で10分間であった。等量のPCR産物を2%アガロースゲル上で電気泳動に付し、臭化エチジウム染色により可視化させた。RT-PCRのすべてのプライマーは少なくとも2つのエクソンに及び、ゲノムDNAによる汚染を回避した。PCR産物の同一性を確認するために、それらを製造業者の指示に従ってpCR2.1-TOPOベクター(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)にクローンした。挿入物をベクター特異的プライマーを用い、自動DNAシーケンサーにて両方向から配列決定した。

【0095】

組織発現

26種のヒト組織より単離した全RNAを、Clontech、Palo Alto、CAから購入した。cDNAを組織培養実験について前記したように調製し、PCR反応に使用した。組織cDNAを2つの遺伝子特異的プライマー(KLK15-F2-配列番号49およびKLK15-R1-配列番号48)(表1)を用いて種々の希釈度で増幅させた。カリクレイン間の高度の相同性に起因して、非特異的増幅を除くため、PCR産物をクローンし、配列決定した。

【0096】

前立腺癌組織

前立腺組織試料を、ドイツ、ベルリン、Charite University Hospitalで前立腺癌の恥骨後前立腺全摘出術を受けた29人の患者から手に入れた。患者は手術前にホルモン療法を受けていなかった。研究を目的としてこれらの組織を使用するのに、Charite Hospitalの倫理委員会の承諾を得た。新たな前立腺組織試料を摘出した同じ前立腺の癌性および非癌性部分から得た。前立腺を除去した直後に組織の薄片を切り裂き、分析するまで液体窒素中で貯蔵した。すべての組織片を以前に記載されるように組織学的分析に付し(31)、その組織が悪性または良性のいずれかであることを裏付けた。組織を液体窒素下で粉碎し、トリゾール試薬を用いて上記したように

10

20

30

40

50

R N A を抽出した。

【 0 0 9 7 】

統計分析

S A S ソフトウェア (S A S I n s t i t u t e , C a r y , N C) を用いて統計分析を行った。同じ患者からの非癌性組織と癌性組織における K L K 1 5 発現の間の違いの分析を非パラメータ性 M c N e m a r 試験を用いて行った。2 項分布を用いて有意水準をコンピュータで計算した。前立腺腫瘍 K L K 1 5 m R N A レベルを定量的に 2 つの範疇 (K L K 1 5 - 低レベル群、および K L K 1 5 - 高レベル群) に分類し、K L K 1 5 ステータスと他の変数の間の関係をフィッシャー精密試験を用いて分析した。

【 0 0 9 8 】

構造分析

「 C l u s t a l X 」ソフトウェアパッケージおよびマルチプルアライメントプログラム (B a y l o r C o l l e g e o f M e d i c i n e , H o u s t o n , T X , U S A) を用いてマルチプルアライメントを行った。系統発生の研究を「 P h y l i p 」ソフトウェアパッケージを用いて行った。距離マトリックスの研究を「 N e i g h b o r - j o i n i n g / U P G M A 」プログラムを用いて行い、パルシモニー (p a r s i m o n y) 分析を「 P r o t p a r s 」プログラムを用いて行った。疎水性の研究を B a y l o r C o l l a g e o f M e d i c i n e s e a r c h l a u n c h e r を用いて行った。シグナルペプチドを「 S i g n a l P 」サーバーを用いて予測した。蛋白構造分析を「 S A P S 」 (蛋白配列の構造分析) プログラムで行った。

【 0 0 9 9 】

結果

K L K 1 5 遺伝子のクローニング

K L K 1 遺伝子 (セントロメア) から K L K 1 4 遺伝子 (テロメア) (7 、 8 、 1 1 、 1 2 、 2 7) に伸びるヒトカリクレイン遺伝子座のついで連続地図は既に確立されている (7 、 8 、 1 1 、 1 2 、 2 7) 。 K L K 1 にセントロメックである他のカリクレイン様遺伝子の存在を調査するために、B A C クローン (B C 7 8 1 1 3 4) を「材料および方法」の記載に従って得た。前立腺特異的抗体 (P S A) およびヒト腎臓カリクレイン (K L K 1) 遺伝子の公開されているゲノム配列によれば、遺伝子特異的プライマーをこれらの各遺伝子について設計し (表 1 、 配列番号 4 7 - 5 0) 、鋳型としてのゲノム D N A を有する特異的 P C R 産物の産生を可能とする、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) に基づく増幅プロトコルを開発した。B A C クローンをこれらの遺伝子特異的プライマーで P C R スクリーニングに付し、このクローンが P S A に対しては陰性であるが、K L K 1 に対しては陽性であること、すなわち、P S A に対してセントロメックである位置を確認した。

【 0 1 0 0 】

以前に記載されているコンピュータプログラム (1 2) によりこのクローンの配列から新規な推定セリンプロテアーゼを予測した。このクローンを消化し、膜上にプロットし、(配列の予測による) 推定 K L K 1 5 遺伝子についての遺伝子特異的プライマーとハイブリダイズし、正のフラグメントをサブクローンし、配列決定してその推定遺伝子の構造を確認した。この推定遺伝子配列をヒト E S T データベースに対してブラストし、2 つの E S T クローンを同定した (G e n B a n k 受入番号 A W 2 7 4 2 7 0 および A W 2 0 5 4 2 0) 。これらの 2 つのクローンは最後のエクソンおよび遺伝子の 3 ' 非翻訳領域ならびにゲノム構造では認められない 1 7 アデニン (A) ヌクレオチドの鎖を有する第 2 E S T 末端と 9 9 % 同一であり、すなわち遺伝子の 3 ' 末端とポリ A 尾部の位置を確認した。

【 0 1 0 1 】

遺伝子の完全な m R N A 構造を同定し、エクソン / イントロンの境界を決定するために、異なるコンピュータ予測のエクソンにて位置付けられたプライマーを用い、鋳型として 2 6 個の一連のヒト組織 c D N A を用いて P C R 反応を行った。P C R 産物を配列決定した。これらのプライマーのうち 2 つ (K L K 1 5 - F 1 - 配列番号 4 7 および K L K 1 5 - R 1 - 配列番号 4 8) (表 1) は異なる組織からの遺伝子の完全なコード化領域を増幅

10

20

30

40

50

することができた。mRNAとゲノム構造との比較は、5個のコード化エクソンと4個の介在イントロンで形成される遺伝子の存在を示した。可能性のあるすべてのリーディングフレームでのmRNA配列の翻訳は、干渉されていないポリペプチド鎖を付与する、さらに以下に記載されるように、カリクレインの高度に保存されている構造モチーフも含有する、たった1つのフレームの存在を示した。

【0102】

KLK15 遺伝子の構造の特徴化

図1に示されるように、KLK15 遺伝子は5個のコード化エクソンと4個の介在イントロンで形成されるが、他のカリクレイン遺伝子では、さらに上流の翻訳されていないエクソンの存在を度外視することができなかった(17、32、33)。エクソン/イントロンのスプライス部位はすべて真核動物細胞スプライス部位(34)のコンセンサス配列と一致する。該遺伝子はさらに、以下に記載されるように、ヒトカリクレイン多重遺伝子族の他のメンバーに共通の構造的特徴と厳格に一致する。遺伝子の予測される蛋白コード化領域は、予測される分子量が28.1 kDaの、推定256個のアミノ酸のポリペプチドをコードする、771 bpで形成される。潜在的な翻訳開始コдонはコンセンサスコザック配列と対合し(35)、その上、位置(-3)にプリンがあり、それは脊椎動物のmRNAの97%で生じる(36)。他の大部分のカリクレイン様遺伝子と同様に、KLK15は位置(+4)にコンセンサスGヌクレオチドを有しないことは注目に値するであろう。

10

【0103】

ヌクレオチド7764-7769(ATTA A A)(配列番号40)は、コンセンサスポリアデニル化シグナル(37)と密接に似ており、17ヌクレオチドの後に、ポリA尾部が続いている。他の潜在的なポリアデニル化シグナルは3'非翻訳領域にて識別できず、上記した配列は実際のポリアデニル化シグナルであることを示唆する。AATA A A(配列番号40)は高度に保存されるが、天然の変種が発生し、ATTA A A(配列番号40)配列は脊椎動物のmRNA配列の12%にて天然のポリアデニル化変種として発生すると報告されている(38)。位置203のグルタミン酸の存在はKLK15が独特な基質特性を有することを示唆する。PSAはその対応する領域にセリン(S)残基を有し、キモトリプシン様活性を有する。多くの他のカリクレインは、一般に、この位置にアスパラギン酸(D)を有し、トリプシン様活性を示す(図2)(6)。

20

30

【0104】

KLK15 蛋白配列は独特であるが、比較分析により、カリクレイン多重遺伝子族の他のメンバーとかなりの程度で相同性を有することが明らかになった。KLK15はトリプシン様セリンプロテアーゼ(TLSP)と51%の蛋白同一性および66%の類似性を示し、ニューロプシンおよびKLK13蛋白と、各々、49、48%の同一性を示す。疎水性分析により、アミノ末端が完全に疎水性であり(図3)、この領域がシグナル配列を受け入れる可能性のあることと矛盾することなく、他のセリンプロテアーゼと類似することが明らかにされた。KLK15 蛋白配列のコンピュータ分析はアミノ酸16と17の間に切断部位(TAA-QD)を予測した。配列アライメント(図2)はまた、他のセリンプロテアーゼの活性化部位に相同的な部位にて、別の潜在的な切断部位(Lys²¹)を明らかにした[リシン(K)またはアルギニン(R)が大部分のケースで存在する](39)。KLK15 ポリペプチド全体に均一に数カ所で分配されている疎水性領域は、球状蛋白と一致し、他のカリクレインおよびセリンプロテアーゼと類似する。かくして、他のカリクレインのケースと同様に、KLK15は、おそらく、不活性な256アミノ酸のプレプロ酵素先駆体として翻訳されている。プレプロ-KLK15は、プレ領域(16個で形成されるシグナルペプチド)およびプロペプチド(5個の残基)を構成する21個の付加的な残基を有する。

40

【0105】

図2に点線で示される領域は、KLK15または他の多重遺伝子族の他のメンバーでは見られない(10、11、13、14)が、古典的なカリクレイン(PSA、KLK1および

50

び K L K 2) にある 1 1 - アミノ酸ループ特性を示す。しかしながら、K L K 1 5 は、他のカリクレインには見られない、1 4 8 - 1 5 5 の位置に独特な 8 個のアミノ酸ループ (H N E P G T A G) (配列番号 1 0) を有する (図 2)。セリンプロテアーゼの活性部位を取り巻く 2 9 個の「不変」アミノ酸が記載されている (4 0)。もちろん、K L K 1 5 でも 2 9 個は保存されている。さらに、非保存アミノ酸の一つ (P r o に代わる S e r ^{1 7 3}) がプロテアーゼ、K L K - L 2 および K L K - L 5 蛋白に見られ、蛋白の進化の研究によれば、同じ基の蛋白に保存して進化的に変更されていることを示す (4 1)。1 2 個システイン残基が推定成熟 K L K 1 5 蛋白に存在しており；そのうちの 1 0 個がすべてのカリクレインに保存されており、ジスルフィド結合を形成すると考えられる。他の 2 つ (C 1 3 1 および C 2 4 3) は P S A、K L K 1、K L K 2 または K L K - L 4 には見られないが、他のすべてのカリクレイン遺伝子の同様の位置に見られ、付加的なジスルフィド結合を形成していると考えられる。

10

【 0 1 0 6 】

K L K 1 5 蛋白と他のセリンプロテアーゼとの系統発生に関連性を推測するために、アミノ酸配列を U n w e i g h t e d P a i r G r o u p M e t h o d w i t h A r i t h m e t i c (U P G M A) 手段および N e i g h b o r - J o i n i n g 距離マトリックス法、および「P r o t p a r s」パルシモニー法を用いて一緒に並べた。得られた系統発生樹はすべて、他のセリンプロテアーゼ (非カリクレイン) が別の群として分類され、それはカリクレインがセリンプロテアーゼの進化における別の工程を示すことを意味するものである。K L K 1 5 は K L K - L 3 および T L S P と一緒に分類され (図 4)、古典的なカリクレイン (h K 1、h K 2 および P S A) はすべての系図において一緒に分類され、古典的なカリクレインとカリクレイン様遺伝子の間の分離は進化の間の初期に生じたことを示唆し、これまでの研究の示唆と一致している (1 3)。

20

【 0 1 0 7 】

K L K 1 5 遺伝子のスプライス変異体

遺伝子特異的プライマー (K L K 1 5 - F 2 - 配列番号 4 9 および K L K 1 5 - R 2 - 配列番号 5 0) (表 1) を用いて K L K 1 5 転写物をスクリーニングする P C R は、試験した組織 c D N A の大部分において 3 本のバンドの存在を明らかにした (図 6)。これらのバンドをゲル精製し、クローンし、そして配列決定した。上のバンドは古典的な形態の遺伝子を示し、下のバンドはスプライス変種 3 である (図 7)。真中のバンドは 2 つの他のスプライス変種を示す。真中のバンドの P C R 産物を S t u I で制限消化に付し、つづいてゲル分離、せいせいおよび配列決定に付し、それが略同じ長さ (スプライス変種 1 はエクソン 3 の 1 1 8 b p を欠いているが、エクソン 4 (1 3 7 b p) を有しており、その一方で、スプライス変種 2 はエクソン 4 を欠いているが、エクソン 3 の付加的な 1 1 8 b p を有する) のスプライス変種 1 および 2 からなることを明らかにした。スプライス変種はすべて末端切断された蛋白産物をコードすると考えられる (図 5)。

30

【 0 1 0 8 】

K L K 1 5 遺伝子の染色体局在化

ヒトカリクレイン遺伝子座に及ぶ多くの重複 B A C クローンを制限分析実験に付し、つづいてその領域の E c o R 1 制限地図 (L L N L ウェブサイトから入手可能である) と比較することで、(K L K 1 5 遺伝子をハーバーする) B C 7 8 1 1 3 4 にテロメリックに隣接する B A C クローン (B C 2 5 4 7 9) の同定が可能となった。2 つのクローンの配列をブラストすることでこれらのクローンの末端が重なっていることが明らかにされた。これらのクローンと共に K L K 1、K L K 3 および K L K 1 5 遺伝子の位置を同定することにより、これら 3 つの遺伝子の相対的位置および転写の方向が正確に定められた。K L K 1 が最もセントロメリックであり、その転写の方向はテロメアからセントロメアであって、つづいて K L K 1 5 がテロメリックであり、同じ方向に転写される。2 つの遺伝子の間の距離は 1 5 0 1 b p の長さである。K L K 3 遺伝子はさらにテロメリックであり、K L K 1 5 から 2 3 3 3 5 の距離にあり、逆方向に転写される (図 6)。これらの結果は、K L K 3 と K L K 1 の間の距離がおおよそ 3 1 K b であると予測する、これまでの報告と一

40

50

致している（６、２７）。

【０１０９】

ＫＬＫ１５遺伝子の組織発現およびホルモン制御

図７に示されるように、ＫＬＫ１５遺伝子は甲状腺で高レベルで発現される。前立腺、唾液腺および副腎、結腸、精巣および腎臓においても低レベルの発現が見られる。ＲＴ－ＰＣＲ特異性を確認するために、代表的なＰＣＲ産物をクローンし、配列決定した。図８はＫＬＫ１５遺伝子がヒトＬＮＣａＰ前立腺癌細胞系においてステロイドホルモンによりアップレギュレートされることを示す。

【０１１０】

前立腺癌におけるＫＬＫ１５発現

正常および癌性前立腺組織でのＫＬＫ１５遺伝子の発現をＲＴ－ＰＣＲで試験した。使用するｃＤＮＡの特性および量を裏付けるため、アクチンを対照となる遺伝子として含める。悪性組織と比較した正常組織におけるＫＬＫ１５遺伝子の相対的発現を試験するために、２９対の前立腺組織を試験した。各対は同じ患者より得られる正常および癌性組織を示す。結果を表２に要約する。２９人の患者のうち１３人はＫＬＫ１５発現が癌組織において有意に高く、３人だけが癌組織よりも非癌組織にてＫＬＫ１５の発現が高かった。ＭｃＭｅｍｍａｒ試験による分析は、正常組織と癌性組織の間の差異が統計的に有意である（ $P = 0.021$ ）ことを示した。ケースの数が少ないため、２項分布を用いて有意水準をコンピューター処理した。前立腺癌の患者をさらに２つの群：（ａ）ＫＬＫ１５発現－陽性（ $N = 21$ ）と、（ｂ）ＫＬＫ１５発現－陰性（または極めて低い）（ $N = 8$ ）に分類した。ＫＬＫ１５発現との関連性を臨床病理学的予後変数と比較した場合、ＫＬＫ１５発現が高いほど、疾患が末期で、腫瘍の等級が高い患者の頻度が高くなることが判明した（表３）。

【０１１１】

論考

カリクレインはセリンプロテアーゼの部分集合である。「カリクレイン」なる語は、一般に、前駆体分子（キニノゲン）に作用し、生物活性なペプチド（キニン）を放出する酵素を記載するために利用される（３、４２）。しかしながら、「組織カリクレイン」なる一般名称は、この酵素の機能的な定義に限定されるものではない。この語は、現在、遺伝子が高度に保存されており、同じ染色体遺伝子座に同時に局在化する蛋白構造を有する一群の酵素を記載するのに使用される。３つの古典的なヒトカリクレイン遺伝子のうち、ＫＬＫ１だけが強力なキニノゲナーゼ活性を有する蛋白をコードする。ＫＬＫ２およびＫＬＫ３遺伝子によりコードされる酵素はキニノゲナーゼ活性が極めて小さい。すでにクローンされている、ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーの１４のメンバーは、以下に示すような、多くの類似点を有する（７、１１）。

- ・すべての遺伝子は同じ染色体領域に局在化する（１９ｑ１３．３－ｑ１３．４）。
- ・すべての遺伝子は適当な位置に触媒性トライアッドが保存されている、すなわち、第２コード化エクソンの末端付近にヒスチジン、第３エクソンの真中にアスパラギン酸、および第５（最終）エクソンの先頭にセリンを有する、推定セリンプロテアーゼをコードする。
- ・すべての遺伝子は５個のコード化エクソン（いくつかは１またはそれ以上の５ノ－非翻訳エクソンを含有する）を有する。
- ・コード化エクソンの大きさは類似しているかまたは同一である。
- ・イントロン相は完全に保存されている。
- ・すべての遺伝子はＤＮＡおよびアミノ酸レベルで有意な配列相同性（３０－８０％）を有する。
- ・これらの多くの遺伝子はステロイドホルモンにより調節される。

【０１１２】

図２および８は新たに同定されたＫＬＫ１５遺伝子が上記した類似性を共有し、かくしてヒトカリクレイン多重遺伝子族の新たなメンバーであることを示す。この遺伝子をＫＬＫ

10

20

30

40

50

15 と称する。

多くのカリクレイン遺伝子が、その主に発現する組織に応じて、ヒト疾患の病因に関連している。KLK1 遺伝子は、炎症 (3)、高血圧 (44)、腎炎および糖尿病性腎疾患 (45、46) を含む、多くの疾患プロセスに関連している。HSCCE (KLK7) と、病理学的角質化および乾癬を含む、皮膚疾患との関係が、これまでに報告されている (47、48)。Little らは、酵素 (KLK6) がアミロイド生成性であり、アルツハイマー病の進行に一の役割を果たしていることを示唆している。ニューロブシン (KLK8) 発現と、癲癇を含む、中枢神経系の疾患との関係を記載する他の報告もある (49、50)。KLK15 は甲状腺で主に発現するため、この腺を生理学および病理生理学的に正常をするにおいて重要な役割を果たしているかもしれない。発見されている他のカリクレインもすべて調べても、多くは甲状腺で発現するが、この組織で最高に高いレベルで発現するものは他に存在しない (7、11)。

10

【0113】

KLK15 遺伝子は、前立腺癌の部分集合を、mRNA レベルでアップレギュレートする。疾患の段階、腫瘍等級およびグリーソン評点で種々の患者の部分集合を KLK15 の定性発現状態 (高いまたは低い) で分けた場合、等級3の腫瘍で、ならびにIII期の、グリーソン評点が6より大きい患者の頻度が大きいことが判明した。これらの知見は KLK15 の過剰発現が該疾患のより悪性の形態と関連しており、予後不良の徴候因子とすることができる (表3)。

【0114】

現在では、多くのカリクレインおよびカリクレイン様遺伝子が悪性腫瘍に関連しているという多くの証拠がある。PSA は今までのところ最も優れた前立腺癌のマーカーである。最近の報告は (KLK2 遺伝子でコードされた) hK2 が前立腺癌のもう一つ別の有用な診断用マーカーであり得ると示唆している (21、51)。NES1 (KLK10) は新規な腫瘍抑制剤遺伝子であるようである (23)。酵素 (KLK6) 遺伝子が主に乳癌および卵巣癌にて特異的に発現され (24)、ヒト角質層キモトリブシン酵素 (HSCCE; KLK7) が卵巣癌にて異常に高いレベルで発現される (25) ことがわかった。もう一つ別の最近になって同定された、暫定的に腫瘍-関連の特異的に発現される遺伝子 - 14 と称される、カリクレイン様遺伝子 (TADG-14 / ニューロブシン) (KLK8) が、卵巣癌組織の約60%で過剰発現されていることが判明した (26)。前立腺 / KLK-L1 (KLK4)、もう一つ別の新たに見出されたカリクレイン様遺伝子が前立腺癌に結合するようである (13)。2種の新たに見出されたカリクレイン、KLK-L4 (KLK13) および KLK-L5 (KLK12) もまた、乳癌にてダウンレギュレートされることが判明した (10)。かくして、広範囲に及ぶ新たな文献は、種々のカリクレイン遺伝子が多くの形態のヒトの癌と複数の関係のあることを示唆する。

20

30

【0115】

複数の選択的にスプライスされた形態の mRNA が存在することはカリクレインではよくあることである。主たる 1.6 kb の転写物に加えて、別個の RNA 種を PSA 遺伝子から転写する (19、52、53)。また、Reigman らは選択的にスプライスされた形態のヒト腺カリクレイン2 (KLK2) 遺伝子を同定したことを報告した (54)。組織カリクレイン遺伝子 (KLK1) の新たな転写物をさらに結腸から単離した (55)。ニューロブシン、最近になって同定されたカリクレイン様遺伝子は、主たる形態に加えて、2つの選択的にスプライシングされた形態を有することが判明した (26、56)。KLK-L4 はまた、異なる選択的にスプライシングされた形態を有することが判明した (10)。KLK15 のスプライス変種は翻訳、分泌および活性化に必要な同一の 5' 配列を有するため、その変種が分泌蛋白をコードすると仮定することも可能である (53)。

40

【0116】

最後に、ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーの新規なメンバー、KLK15 を特徴付け、ヒトカリクレイン遺伝子座 (染色体 19q13.3 - q13.4) までの地図を作成する。この遺伝子は古典的形態に加えて3つの関連するスプライス形態を有する。KLK15

50

は、甲状腺において優勢的であるが、種々の組織にて発現され、より悪性の形態の前立腺癌にてアップレギュレートされるようであり、その発現はステロイドホルモンにより影響を受ける。2、3の他のカリクレインは有益な腫瘍マーカーとして既に用いられているため、KLK15にも同様に臨床的な用途を見出すことができる。

【0117】

好ましい具体例において、本発明の原理を説明かつ記載したが、当業者であれば、かかる原理から逸脱することなく、本発明を整然と、細部にわたって修飾できることが認識できるであろう。特許請求の範囲内にあるすべての修飾を特許請求するものである。

本明細書に言及されているすべての刊行物、特許および特許出願は、たとえ、個々の刊行物、特許または特許出願が出典明示によりそっくりそのまま本明細書の一部とすることを具体的かつ個別的に意図するものであったとしても、その同じ程度までそっくりそのまま出典を明示することにより本明細書の一部とされる。

10

【0118】

表 1

ゲノムPCR増幅に用いるプライマー
遺伝子 プライマー名および配列

ジンバンク
受入番号

KLK1	KLK1-A:	ATC CCT CCA TTC CCA TCT TT	L10038
	KLK1-B:	CAC ATA CAA TTC TCT GGT TC	
KLK2	KLK2-A:	AGT GAC ACT GTC TCA GAA TT	M18157
	KLK2-B:	CCC CAA TCT CAC GAG TGC AC	
PSA	B5-A:	GTC GGC TCT GGA GAC ATT TC	M27274
	B5-B:	AAC TGG GGA GGC TTG AGT C	
KLK15	KLK15-F1:	CTC CTT CCT GCT GGC ATC CA	AF24215
	KLK15-R1:	ATC ACA CGG GTG GTC ATG TG	
	KLK15-F2:	CAA GTG GCT CTC TAC GAG CG	
	KLK15-R2:	GAC ACC AGG CTT GGT GGT GT	

20

* すべてのプライマーは 5' から 3' への方で表されている。

【0119】

表 2

29 対の癌性および非癌性前立腺組織における KLK15 発現

KLK15 発現	患者数	P 値 *
正常細胞に対して癌細胞にて高い発現	13	
正常細胞に対して癌細胞にて低い発現	3	
両細胞にて、略等しいが、高い発現	8	
両細胞にて、略等しいが、低い発現 (または無し)	5	0.021

* P 値は 2 項分布を用いて McNemar 試験により算定した。

【0120】

表 3

一次性前立腺癌の 29 人の患者における KLK15 発現と他の臨床病理学的変数との間の関係

30

40

変数	患者	患者の数 (%)		P値*
		KLK15陽性	KLK15陰性	
段階				
I / II	20	8 (40)	12 (60)	
III	9	0 (0)	9 (100)	0.033
等級				
G1 / 2	23	8 (34.8)	15 (65.2)	
G3	6	0 (0)	6 (100)	0.15
グリーソン評点				
6以下	22	7 (31.8)	15 (62.2)	
6より大きい	6	0 (0)	6 (100)	0.14
不明	1			

10

* フィッシャーの直接確率検定

【0121】

明細書に言及されている参考文献の列記

1. Kraut, H., K., F. E., and Werle, E. (1930) *Physiol. Chem.* 189, 97-106
2. Werle, E. (1934) *Biochem. Z* 269, 415-434
3. Clements, J. (1997) in *The Kinin System* (Farmer, S., ed), pp. 71-97, Academic Press, New York
4. Evans, B. A., Drinkwater, C. C., and Richards, R. I. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 8027-34
5. Ashley, P. L., and MacDonald, R. J. (1985) *Biochemistry* 24, 4520-7
6. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., Suurmeijer, L., Cleutjens, C. B., and Trapman, J. (1992) *Genomics* 14, 6-11
7. Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Luo, L. Y., Magklara, A., and Obiezu, C. V. (2000) *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 54-60
8. Yousef, G. M., Obiezu, C. V., Luo, L. Y., Black, M. H., and Diamandis, E. P. (1999) *Cancer Res.* 59, 4252-6
9. Yousef, G. M., and Diamandis, E. P. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 37511-6
10. Yousef, G. M., Chang, A., and Diamandis, E. P. (2000) *J Biol Chem* 275, 11891-8.
11. Yousef, G. M., and Diamandis, E. P. (2000) *Genomics* 65, 184-194
12. Yousef, G. M., Luo, L. Y., and Diamandis, E. P. (1999) *Anticancer Res.* 19, 2843-52
13. Nelson, P. S., Gan, L., Ferguson, C., Moss, P., Gelinas, R., Hood, L., and Wang, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3114-9
14. Little, S. P., Dixon, E. P., Norris, F., Buckley, W., Becker, G. W., Johnson, M., Dobbins, J. R., Wyrick, T., Miller, J. R., Ma

50

- c Kellar, W., Hepburn, D., Corvalan, J., McClure, D., Liu, X., Stephenson, D., Clemens, J., and Johnstone, E. M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25135 - 42
15. Liu, X. L., Wazer, D. E., Watanabe, K., and Band, V. (1996) *Cancer Res.* 56, 3371 - 9
16. Hansson, L., Stromqvist, M., Backman, A., Wallbrandt, P., Carlstein, A., and Egelrud, T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19420 - 6
17. Yoshida, S., Taniguchi, M., Hirata, A., and Shiosaka, S. (1998) *Gene* 213(1-2), 9 - 16 10
18. Stephenson, S. A., Verity, K., Ashworth, L. K., and Clements, J. A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 23210 - 4
19. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A., Romijn, J. C., and Trapman, J. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 95 - 102
20. Diamandis, E. P. (1998) *Trends Endocrinol. Metab.* 9, 310 - 316 20
21. Stenman, U. H. (1999) *Clin. Chem.* 45, 753 - 4
22. Partin, A. W., Catalona, W. J., Finlay, J. A., Darte, C., Tindall, D. J., Young, C. Y., Klee, G. G., Chan, D. W., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L., and Woodrum, D. L. (1999) *Urology* 54, 839 - 45
23. Goyal, J., Smith, K. M., Cowan, J. M., Wazer, D. E., Lee, S. W., and Band, V. (1998) *Cancer Res.* 58, 4782 - 6 30
24. Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Stenman, G., Mok, S. C., and Sager, R. (1996) *Mol. Med.* 2, 624 - 36
25. Tanimoto, H., Underwood, L. J., Shigemasa, K., Yan Yan, M. S., Clarke, J., Parmley, T. H., and O'Brien, T. J. (1999) *Cancer* 86, 2074 - 82
26. Underwood, L. J., Tanimoto, H., Wang, Y., Shigemasa, K., Parmley, T. H., and O'Brien, T. J. (1999) *Cancer Res.* 59(17), 4435 - 9 40
27. Yousef, G. M., Chang, A., and Diamandis, E. P. (2000) submitted
28. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389 - 402
29. Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., and Soares, M. B. (1996) *Genomics* 33, 151 - 2 50

30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY
31. Meyer, A., Jung, K., Lein, M., Rudolph, B., Schnorr, D., and Loening, S. A. (1997) *Int. J. Cancer* 74, 630-6
32. Luo, L., Herbrich, J. A., Scherer, S. W., Beatty, B., Squire, J., and Diamandis, E. P. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247(3), 580-6 10
33. Yousef, G. M., Luo, L. Y., Scherer, S. W., Sotiropoulou, G., and Diamandis, E. P. (1999) *Genomics* 62(2), 251-9
34. Iida, Y. (1990) *J. Theor. Biol.* 145(4), 523-33
35. Kozak, M. (1991) *J. Cell Biol.* 115(4), 887-903
36. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(20), 8125-48 20
37. Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G. (1976) *Nature* 263, 211-4
38. Sheets, M. D., Ogg, S. C., and Wickens, M. P. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(19), 5799-805
39. Keil, B. (1971) in *The enzymes* (P. D. Boyer, E., ed) Vol. 3, 3rd Ed., pp. 249-275, Academic Press, New York
40. Dayhoff, M. O. (1978) *Natl. Biomed. Res. Found.* 5, 79-81 30
41. Miyata, T., Miyazawa, S., and Yasunaga, T. (1979) *J. Mol. Evol.* 12(3), 219-36
42. Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., and Worthy, K. (1992) *Pharmacol. Rev.* 44(1), 1-80
43. Diamandis, E. P., Yousef, G., Clements, J. et al., (2000) *Clin. Chem. In press*
44. Margolius, H. S., Horwitz, D., Pisano, J. J., and Keiser, H. R. (1974) *Circ. Res.* 35(6), 820-5
45. Jaffa, A. A., Chai, K. X., Chao, J., Chao, L., and Mayfield, R. K. (1992) *Kidney Int.* 41(4), 789-95 40
46. Cumming, A. D., Walsh, T., Wojtacha, D., Fleming, S., Thomson, D., and Jenkins, D. A. (1994) *Clin. Sci.* 87(1), 5-11
47. Sondell, B., Dyberg, P., Anneroth, G. K., Ostman, P. O., and Egelrud, T. (1996) *Acta. Derm. Venereol.* 76(3), 177-81
48. Ekholm, E., and Egelrud, T. (1999) *Arch. Dermatol. Res.* 291(4), 195-200 50

49. Momota, Y., Yoshida, S., Ito, J., Shibata, M., Kato, K., Sakurai, K., Matsumoto, K., and Shiosaka, S. (1998) Eur. J. Neurosci. 10(2), 760-4
50. Kishi, T., Kato, M., Shimizu, T., Kato, K., Matsumoto, K., Yoshida, S., Shiosaka, S., and Hakoshima, T. (1999) J. Biol. Chem. 274, 4220-4
51. Black, M. H., Magklara, A., Obiezu, C. V., Melegos, D. N., and Diamandis, E. P. (1999) Clin. Chem. 45(6 Pt 1), 790-9 10
52. Riegman, P. H., Klaassen, P., van der Korput, J. A., Romijn, J. C., and Trapman, J. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 155(1), 181-8
53. Heuze, N., Olayat, S., Gutman, N., Zani, M. L., and Courty, Y. (1999) Cancer Res. 59, 2820-4
54. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, H. A., Romijn, J. C., and Trapman, J. (1991) Mol. Cell Endocrinol. 76(1-3), 181-90 20
55. Chen, L. M., Murray, S. R., Chai, K. X., Chao, L., and Chao, J. (1994) Braz. J. Med. Biol. Res. 27(8), 1829-38
56. Mitsui, S., Tsuruoka, N., Yamashiro, K., Nakazato, H., and Yamaguchi, N. (1999) Eur. J. Biochem. 260(3), 627-34

【図面の簡単な説明】

30

【図1】KLK15遺伝子のゲノム機構および部分的ゲノム配列を示す。

【図2】KLK15の推定アミノ酸配列と、カリクレインマルチ遺伝子ファミリーのメンバー（配列番号25-38）との位置合わせを示す。

【図3】前立腺特異的抗原（PSA）と比較した場合の、KLK15蛋白の疎水性および親水性をプロットした図を示す。

【図4】15種のカリクレインと他のセリンプロテアーゼについて、推定される系統樹を示す。

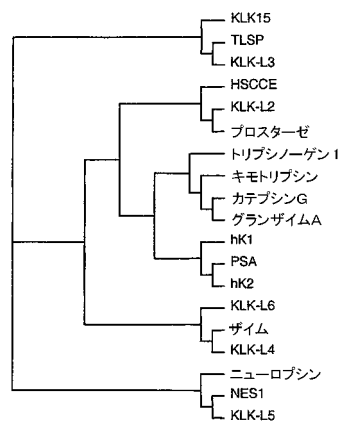
【図5】KLK15遺伝子の種々のスプライス変種の模式図である。

【図6】染色体19q13.3-q13.4上のKLK1、KLK15およびKLK3遺伝子の相対的位置を示す。 40

【図7】RT-PCRで測定した、KLK15遺伝子の組織発現を示す。

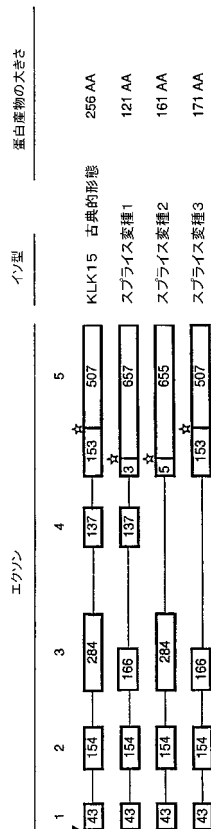
【図8】LNCaP前立腺癌細胞系におけるKLK15遺伝子のホルモン調節を示す。

【図9】15種のカリクレイン遺伝子のコーディング領域を比較した模式図である。



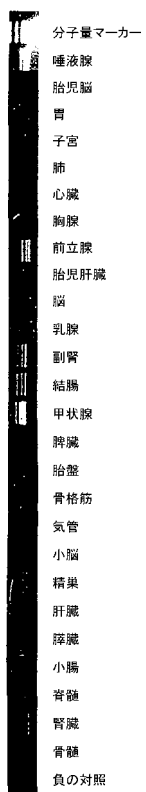
【 図 5 】

Figure 5



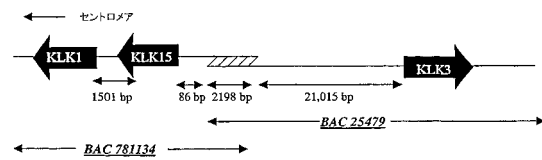
【 図 7 】

Figure 7



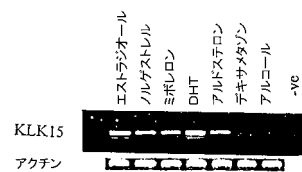
【 図 6 】

Figure 6



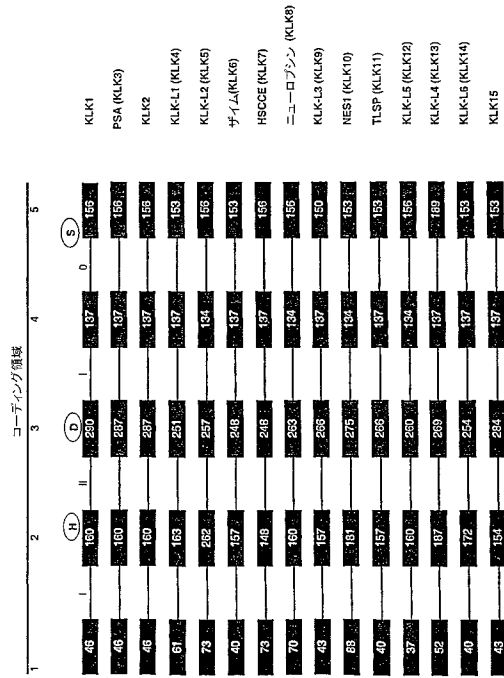
【 図 8 】

Figure 8



【 図 9 】

Figure 9



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



PCT (10) International Publication Number
WO 02/14485 A2

M. [EG/CA]; 50 Stephanie Street, Suite 1701, Toronto, Ontario M5T 1B3 (CA). **DIAMANDIS, Eleftherios, P. [CA/CA];** 44 Gerrard Street West, Suite 1504, Toronto, Ontario M5G 2K2 (CA).

(74) Agent: **BERESKIN & PARR**; 40 King Street West, Box 401, 40th Floor, Toronto, Ontario M5H 3Y2 (CA).

(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, DT, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

[Continued on next page]

[Continued on next page]

[Continued on next page]

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid molecules, proteins encoded by such nucleic acid molecules; and use of the proteins and nucleic acid molecule.

[illegible]

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid molecules, proteins encoded by such nucleic acid molecules; and use of the proteins and nucleic acid molecule.

WO 02/14485 A2

WO 02/14485 A2

patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

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.

Published:

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

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 1 -

TITLE: Novel Kallikrein Gene**FIELD OF THE INVENTION**

5 The invention relates to nucleic acid molecules, proteins encoded by such nucleic acid molecules; and use of the proteins and nucleic acid molecules.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Kallikreins are a group of serine proteases that are found in diverse tissues and biological fluids. The term "kallikrein" was first introduced by Werle and colleagues who found high levels of their original isolates in the pancreas (in Greek, the "kallikreas") (1,2). Kallikreins are divided into two main groups; the plasma kallikrein, which is a single gene (3), and the tissue kallikreins, which are encoded by a large multi-gene family in rodents (4,5). Until recently, the human kallikrein gene family was thought to consist of only three members (6). However, 11 new members of the kallikrein gene family have been identified (7-18). The progress in this area of investigation has recently been reviewed (7).

Prostate specific antigen (PSA), currently the most useful tumor marker for prostate cancer diagnosis and monitoring, is a member of the human kallikrein gene family of serine proteases (19,20). In addition to PSA, human glandular kallikrein 2 (hK2, encoded by the KLK2 gene) has been proposed as an adjuvant diagnostic marker for prostate cancer (21,22). Moreover, accumulating evidence indicates that other members of the expanded kallikrein gene family may be associated with malignancy (7). The normal epithelial cell-specific 1 gene (NES1) (KLK10, according to the approved human tissue kallikrein gene nomenclature) was found to be a novel tumor suppressor, which is down-regulated during breast cancer progression (23). Other gene family members, including zyme (KLK6), neuropsin (KLK8), and human stratum comeum chymotryptic enzyme (HSCCE; KLK7) were also found to be differentially expressed in certain types of malignancies (24-26).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors identified a nucleic acid molecule encoding a novel kallikrein. The nucleic acid molecule maps to chromosome 19q13.3-q13.4 and is located between the *kik1* and *kik3* genes. The novel nucleic acid molecule designated "*kik15*" has three alternatively spliced forms and is primarily expressed in the thyroid gland, and to a lower extent in the prostate, salivary and adrenal glands, colon, testis, and kidney. The expression of the nucleic acid is up-regulated in prostate cancer and it is under steroid hormone regulation in the LNCaP prostate cancer cell line. Higher expression of *kik15* is associated with more aggressive (higher stage and higher grade) prostate tumors.

The novel kallikrein protein described herein is referred to as "Kallikrein 15", "KLK15", or "KLK15 Protein". The gene encoding the protein is referred to as "*kik15*".

35 Broadly stated the present invention relates to an isolated nucleic acid molecule of at least 30 nucleotides which hybridizes to one or more of SEQ. ID. NO. 1 through 5, or 10 through 24, or the complement of one or more of SEQ ID NO. 1 through 5, or 10 through 24 under stringent hybridization conditions.

The invention also contemplates a nucleic acid molecule comprising a sequence encoding a truncation

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 2 -

of a KLK15 Protein, an analog, or a homolog of a KLK15 Protein or a truncation thereof. (KLK15 Protein and truncations, analogs and homologs of KLK15 Protein are also collectively referred to herein as "KLK15 Related Proteins").

5 The nucleic acid molecules of the invention may be inserted into an appropriate expression vector, i.e. a vector that contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Accordingly, recombinant expression vectors adapted for transformation of a host cell may be constructed which comprise a nucleic acid molecule of the invention and one or more transcription and translation elements linked to the nucleic acid molecule.

10 The recombinant expression vector can be used to prepare transformed host cells expressing KLK15 Related Proteins. Therefore, the invention further provides host cells containing a recombinant molecule of the invention. The invention also contemplates transgenic non-human mammals whose germ cells and somatic cells contain a recombinant molecule comprising a nucleic acid molecule of the invention, in particular one which encodes an analog of the KLK15 Protein, or a truncation of the KLK15 Protein.

15 The invention further provides a method for preparing KLK15 Related Proteins utilizing the purified and isolated nucleic acid molecules of the invention. In an embodiment a method for preparing a KLK15 Related Protein is provided comprising (a) transferring a recombinant expression vector of the invention into a host cell; (b) selecting transformed host cells from untransformed host cells; (c) culturing a selected transformed host cell under conditions which allow expression of the KLK15 Related Protein; and (d) isolating the KLK15 Related Protein.

20 The invention further broadly contemplates an isolated KLK15 Protein comprising an amino acid sequence of SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9.

The KLK15 Related Proteins of the invention may be conjugated with other molecules, such as proteins, to prepare fusion proteins. This may be accomplished, for example, by the synthesis of N-terminal or C-terminal fusion proteins.

25 The invention further contemplates antibodies having specificity against an epitope of a KLK15 Related Protein of the invention. Antibodies may be labeled with a detectable substance and used to detect proteins of the invention in tissues and cells. Antibodies may have particular use in therapeutic applications, for example to react with tumor cells, and in conjugates and immunotoxins as target selective carriers of various agents which have antitumor effects including chemotherapeutic drugs, toxins, immunological response modifiers, enzymes, and radioisotopes.

30 The invention also permits the construction of nucleotide probes that are unique to the nucleic acid molecules of the invention and/or to proteins of the invention. Therefore, the invention also relates to a probe comprising a nucleic acid sequence of the invention, or a nucleic acid sequence encoding a protein of the invention, or a part thereof. The probe may be labeled, for example, with a detectable substance and it may be used to select from a mixture of nucleotide sequences a nucleic acid molecule of the invention including nucleic acid molecules coding for a protein which displays one or more of the properties of a protein of the invention. A probe may be used to mark tumors.

35

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 3 -

The invention also provides antisense nucleic acid molecules e.g. by production of a mRNA or DNA strand in the reverse orientation to a sense molecule. An antisense nucleic acid molecule may be used to suppress the growth of a KLK15 expressing (e.g. cancerous) cell.

5 The invention still further provides a method for identifying a substance that binds to a protein of the invention comprising reacting the protein with at least one substance which potentially can bind with the protein, under conditions which permit the formation of complexes between the substance and protein and detecting binding. Binding may be detected by assaying for complexes, for free substance, or for non-complexed protein. The invention also contemplates methods for identifying substances that bind to other intracellular proteins that interact with a KLK15 Related Protein. Methods can also be utilized which identify
10 compounds which bind to KLK15 gene regulatory sequences (e.g. promoter sequences).

Still further the invention provides a method for evaluating a compound for its ability to modulate the biological activity of a KLK15 Related Protein of the invention. For example a substance which inhibits or enhances the interaction of the protein and a substance which binds to the protein may be evaluated. In an embodiment, the method comprises providing a known concentration of a KLK15 Related Protein, with a
15 substance which binds to the protein and a test compound under conditions which permit the formation of complexes between the substance and protein, and removing and/or detecting complexes.

Compounds which modulate the biological activity of a protein of the invention may also be identified using the methods of the invention by comparing the pattern and level of expression of the protein of the invention in tissues and cells, in the presence, and in the absence of the compounds.

20 The proteins of the invention, antibodies, antisense nucleic acid molecules, and substances and compounds identified using the methods of the invention, and peptides of the invention may be used to modulate the biological activity of a KLK15 Related Protein of the invention, and they may be used in the treatment of conditions such as cancer (particularly prostate, colon, kidney, and testicular cancer) and thyroid disorders in a subject. Accordingly, the substances and compounds may be formulated into compositions for
25 administration to individuals suffering from disorders such as cancer (particularly prostate, colon, kidney, and testicular cancer) and thyroid disorders in a subject. In particular, the antibodies, antisense nucleic acid molecules, substances and compounds may be used to treat patients who have a KLK15 Related Protein in, on, or on, their cancer cells.

Therefore, the present invention also relates to a composition comprising one or more of a protein of the invention, or a substance or compound identified using the methods of the invention, and a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or diluent. A method for treating or preventing a disorder such as cancer (particularly prostate, thyroid, colon, kidney, and testicular cancer) and thyroid disorders in a subject is also provided comprising administering to a patient in need thereof, a KLK15 Related Protein of the invention, a substance or compound identified using the methods of the invention, or a composition of the
35 invention.

Another aspect of the invention is the use of a KLK15 Related Protein, peptides derived therefrom, or chemically produced (synthetic) peptides, or any combination of these molecules, for use in the preparation

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 4 -

of vaccines to prevent cancer and/or to treat cancer, in particular to prevent and/or treat cancer in patients who have a KLK15 Related Protein detected on their cells. These vaccine preparations may also be used to prevent patients from having tumors prior to their occurrence.

5 The invention broadly contemplates vaccines for stimulating or enhancing in a subject to whom the vaccine is administered production of antibodies directed against a KLK15 Related Protein.

The invention also provides a method for stimulating or enhancing in a subject production of antibodies directed against a KLK15 Related Protein. The method comprises administering to the subject a vaccine of the invention in a dose effective for stimulating or enhancing production of the antibodies.

10 The invention further provides methods for treating, preventing, or delaying recurrence of cancer. The methods comprise administering to the subject a vaccine of the invention in a dose effective for treating, preventing, or delaying recurrence of cancer.

In other embodiments, the invention provides a method for identifying inhibitors of a KLK15 Related Protein interaction, comprising

- 15 (a) providing a reaction mixture including the KLK15 Related Protein and a substance that binds to the KLK15 Related Protein, or at least a portion of each which interact;
- (b) contacting the reaction mixture with one or more test compounds;
- (c) identifying compounds which inhibit the interaction of the KLK15 Related Protein and substance.

20 In certain preferred embodiments, the reaction mixture is a whole cell. In other embodiments, the reaction mixture is a cell lysate or purified protein composition. The subject method can be carried out using libraries of test compounds. Such agents can be proteins, peptides, nucleic acids, carbohydrates, small organic molecules, and natural product extract libraries, such as those isolated from animals, plants, fungus and/or microbes. Still another aspect of the present invention provides a method of conducting a drug discovery business comprising:

- 25 (a) providing one or more assay systems for identifying agents by their ability to inhibit or potentiate the interaction of a KLK15 Related Protein and a substance that binds to the protein;
- (b) conducting therapeutic profiling of agents identified in step (a), or further analogs thereof, for efficacy and toxicity in animals; and
- (c) formulating a pharmaceutical preparation including one or more agents identified in step (b)
- 30 as having an acceptable therapeutic profile.

In certain embodiments, the subject method can also include a step of establishing a distribution system for distributing the pharmaceutical preparation for sale, and may optionally include establishing a sales group for marketing the pharmaceutical preparation.

35 Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples while indicating preferred embodiments of the invention are given by way of illustration only, since various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 5 -

skilled in the art from this detailed description.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention will now be described in relation to the drawings in which:

Figure 1 shows the genomic organization and partial genomic sequence of the KLK15 gene. Intronic sequences are not shown except for the splice junction areas. Introns are shown with lower case letters and exons with capital letters. The coding nucleotides are shown in bold and the 3' untranslated region follows the TGA stop codon (encircled). The translated amino acids of the coding region are shown underneath by a single letter abbreviation. The start and stop codons are encircled and the exon-intron junctions are underlined. The catalytic residues are boxed. The putative polyadenylation signal is underlined. The exact start of the first coding exon was not determined.

Figure 2 shows an alignment of the deduced amino acid sequence of KLK15 with members of the kallikrein multi-gene family (SEQ ID NOs. 25-38). Dashes represent gaps to bring the sequences to better alignment. The residues of the catalytic triad (H, D, S) are shown in italics. Identical amino acids are highlighted in black and similar residues in grey. The 29 invariant serine protease residues are marked by (•) on the bottom, and the cysteine residues by (+) on top of each block. The predicted cleavage sites of the signal and activation peptides are indicated by arrows. The dotted area represents the kallikrein loop sequence. The trypsin-like cleavage pattern predicted by the presence of the "D" residue is indicated by (*). KLK15 has an "E" in this position. A unique 8 amino acid sequence, HNEPGTAG (SEQ ID NO. 10), is present at positions 148-155 of the KLK15 gene.

Figure 3 is a plot of hydrophobicity and hydrophilicity of the KLK15 protein, as compared with the prostate specific antigen (PSA). Note the hydrophobic region at the amino terminus, suggesting presence of a signal peptide.

Figure 4 is a dendrogram of the predicted phylogenetic tree for 15 kallikreins and a few other serine proteases. The neighbor-joining method was used to align KLK15 with other serine proteases and members of the kallikrein gene family. The tree grouped the classical kallikreins (hK1, hK2, and PSA) together and aligned KLK15 in one group with TLSP and KLK-L3 genes. Other serine proteases were aligned in different groups, as shown. KLK represents kallikrein; KLK-L represents kallikrein-like; TLSP represents trypsin-like serine protease; NES1 represents normal epithelial cell-specific gene; PSA represents prostate specific antigen; hK1 and hK2 represents human glandular kallikrein 1 and 2, respectively; and HSCCE represents human stratum corneum chymotryptic enzyme.

Figure 5 is a schematic presentation of the different splice variants of the KLK15 gene. Exons are shown by boxes and introns by the connecting lines. Numbers inside boxes represent the exon lengths in base pairs. The arrowhead points to the common start codon and stars to the stop codon positions. The length of the predicted polypeptide product is indicated beside each variant in amino acids (AA). The alternative splicing and/or exon skips create a frame shift, which leads to a premature termination.

Figure 6 shows the relative locations of KLK1, KLK15, and KLK3 genes on chromosome 19q13.3-q13.4. The two overlapping BAC clones are identified, and the overlap region is hatched. Genes are

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 6 -

represented by horizontal arrows denoting the direction of the coding sequence. Distances between genes are mentioned in base pairs. Figure is not drawn to scale.

Figure 7 shows tissue expression of the KLK15 gene, as determined by RT-PCR. KLK15 is primarily expressed in the thyroid gland, and to a lower extent in the prostate, salivary and adrenal glands, colon, testis and kidney. M= Molecular weight marker. For explanation of the multiple PCR bands (alternatively spliced forms) see the Example. PCR was performed with primers KLK15-F2 and KLK15-R1.

Figure 8 shows hormonal regulation of the KLK15 gene in the LNCaP prostate cancer cell line. DHT = dihydrotestosterone. Steroids were added at 10^{-8} M final concentrations. (-ve) = negative control. Actin was used as a control gene.

Figure 9 is a schematic diagram showing the comparison of the coding regions of the 15 kallikrein genes. Exons are shown by solid bars and introns by the connecting lines. Letters above boxes indicate relative positions of the catalytic triad that was found to be conserved in all genes; H denotes histidine, D aspartic acid and S serine. Roman numbers indicate intron phases. The intron phase refers to the location of the intron within the codon; I denotes that the intron occurs after the first nucleotide of the codon, II the intron occurs after the second nucleotide, 0 the intron occurs between codons. The intron phases are conserved in all genes. Numbers inside boxes indicate exon lengths in base pairs. Names inside brackets represent the official nomenclature approved by the human gene nomenclature committee. Untranslated 3' and 5' regions and 5' untranslated exons are not shown.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See for example, Sambrook, Fritsch, & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985); *Transcription and Translation* B.D. Hames & S.J. Higgins eds (1984); *Animal Cell Culture* R.I. Freshney, ed. (1986); *Immobilized Cells and enzymes* IRL Press, (1986); and B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

1. Nucleic Acid Molecules of the Invention

As hereinbefore mentioned, the invention provides an isolated nucleic acid molecule having a sequence encoding a KLK15 Protein. The term "isolated" refers to a nucleic acid substantially free of cellular material or culture medium when produced by recombinant DNA techniques, or chemical reactants, or other chemicals when chemically synthesized. An "isolated" nucleic acid may also be free of sequences which naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid molecule) from which the nucleic acid is derived. The term "nucleic acid" is intended to include DNA and RNA and can be either double stranded or single stranded. In an embodiment, a nucleic acid molecule of the invention encodes a protein comprising an amino acid sequence of SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9 preferably a nucleic acid molecule of the invention comprises a nucleic acid sequence of one or more of SEQ.ID.NO. 1 through 5, or 10 through

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 7 -

24.

In an embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule which comprises:

- (i) a nucleic acid sequence encoding a protein having substantial sequence identity with an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9;
- 5 (ii) a nucleic acid sequence encoding a protein comprising an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9;
- (iii) nucleic acid sequences complementary to (i) or (ii);
- (iv) a degenerate form of a nucleic acid sequence of (i) or (ii);
- 10 (v) a nucleic acid sequence capable of hybridizing under stringent conditions to a nucleic acid sequence in (i), (ii) or (iii);
- (vi) a nucleic acid sequence encoding a truncation, an analog, an allelic or species variation of a protein comprising an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9; or
- (vii) a fragment, or allelic or species variation of (i), (ii) or (iii).

Preferably, a purified and isolated nucleic acid molecule of the invention comprises:

- 15 (i) a nucleic acid sequence comprising the sequence of one or more of SEQ.ID.NO. 1 through 5 or 10 through 24, wherein T can also be U;
- (ii) nucleic acid sequences complementary to (i), preferably complementary to the full nucleic acid sequence of one or more of SEQ.ID.NO. 1 through 5 or 10 through 24;
- (iii) a nucleic acid capable of hybridizing under stringent conditions to a nucleic acid of (i) or (ii)
- 20 (iv) and preferably having at least 18 nucleotides; or
- (iv) a nucleic acid molecule differing from any of the nucleic acids of (i) to (iii) in codon sequences due to the degeneracy of the genetic code.

The invention includes nucleic acid sequences complementary to a nucleic acid encoding a protein comprising an amino acid sequence of SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9 preferably the nucleic acid sequences complementary to a full nucleic acid sequence of one or more of SEQ.ID.NO. 1 through 5 or 10 through 24.

The invention includes nucleic acid molecules having substantial sequence identity or homology to nucleic acid sequences of the invention or encoding proteins having substantial identity or similarity to the amino acid sequence of SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9. Preferably, the nucleic acids have substantial sequence identity for example at least 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, or 85% nucleic acid identity; more preferably 90% nucleic acid identity; and most preferably at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% sequence identity. "Identity" as known in the art and used herein, is a relationship between two or more amino acid sequences or two or more nucleic acid sequences, as determined by comparing the sequences. It also refers to the degree of sequence relatedness between amino acid or nucleic acid sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. Identity and similarity are well known terms to skilled artisans and they can be calculated by conventional methods (for example see 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,

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 8 -

- Griffin, A.M. and Griffin, H.G. eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J. eds. M. Stockton Press, New York, 1991, Carillo, H. and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.* 48:1073, 1988). Methods which are designed to give the largest match between the sequences are generally preferred.
- 5 Methods to determine identity and similarity are codified in publicly available computer programs including the GCG program package (Devereux J. et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387, 1984); BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul, S.F. et al. *J. Molec. Biol.* 215: 403-410, 1990). The BLAST X program is publicly available from NCBI and other sources (BLAST Manual, Altschul, S. et al. NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S. et al. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990).
- 10 Isolated nucleic acid molecules encoding a KLK15 Protein, and having a sequence which differs from a nucleic acid sequence of the invention due to degeneracy in the genetic code are also within the scope of the invention. Such nucleic acids encode functionally equivalent proteins (e.g. a KLK15 Protein) but differ in sequence from the sequence of a KLK15 Protein due to degeneracy in the genetic code. As one example, DNA sequence polymorphisms within the nucleotide sequence of a KLK15 Protein may result in silent mutations
- 15 which do not affect the amino acid sequence. Variations in one or more nucleotides may exist among individuals within a population due to natural allelic variation. Any and all such nucleic acid variations are within the scope of the invention. DNA sequence polymorphisms may also occur which lead to changes in the amino acid sequence of a KLK15 Protein. These amino acid polymorphisms are also within the scope of the present invention.
- 20 Another aspect of the invention provides a nucleic acid molecule which hybridizes under stringent conditions, preferably high stringency conditions to a nucleic acid molecule which comprises a sequence which encodes a KLK15 Protein having an amino acid sequence shown in SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9. Appropriate stringency conditions which promote DNA hybridization are known to those skilled in the art, or can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. For example, 6.0 x sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by a wash of 2.0 x SSC at 50°C may be
- 25 employed. The stringency may be selected based on the conditions used in the wash step. By way of example, the salt concentration in the wash step can be selected from a high stringency of about 0.2 x SSC at 50°C. In addition, the temperature in the wash step can be at high stringency conditions, at about 65°C.
- It will be appreciated that the invention includes nucleic acid molecules encoding a KLK15 Related
- 30 Protein including truncations of a KLK15 Protein, and analogs of a KLK15 Protein as described herein. The truncated nucleic acids or nucleic acid fragments may correspond to a sequence comprising or consisting of nucleotides 1581-1623, 1524-5258, 5259-5412, 5413-5912, 5913-6078, 6197-6316, 6079-6316, 6317-6453, 6454-7126, 6079-7126, 7127-7786, 5913-6196, 7127-7131, or 7127-7279 of SEQ ID NO. 1, or SEQ ID NO. 39, 47, 48, 49, or 50. It will further be appreciated that variant forms of the nucleic acid molecules of the
- 35 invention which arise by alternative splicing of an mRNA corresponding to a cDNA of the invention are encompassed by the invention (See SEQ ID NO. 3, 4, and 5).
- An isolated nucleic acid molecule of the invention which comprises DNA can be isolated by preparing

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 9 -

a labelled nucleic acid probe based on all or part of a nucleic acid sequence of the invention. The labeled nucleic acid probe is used to screen an appropriate DNA library (e.g. a cDNA or genomic DNA library). For example, a cDNA library can be used to isolate a cDNA encoding a KLK15 Related Protein by screening the library with the labeled probe using standard techniques. Alternatively, a genomic DNA library can be similarly screened to isolate a genomic clone encompassing a gene encoding a KLK15 Related Protein. Nucleic acids isolated by screening of a cDNA or genomic DNA library can be sequenced by standard techniques.

An isolated nucleic acid molecule of the invention which is DNA can also be isolated by selectively amplifying a nucleic acid encoding a KLK15 Related Protein using the polymerase chain reaction (PCR) methods and cDNA or genomic DNA. It is possible to design synthetic oligonucleotide primers from the nucleotide sequence of the invention for use in PCR. A nucleic acid can be amplified from cDNA or genomic DNA using these oligonucleotide primers and standard PCR amplification techniques. The nucleic acid so amplified can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. cDNA may be prepared from mRNA, by isolating total cellular mRNA by a variety of techniques, for example, by using the guanidinium-thiocyanate extraction procedure of Chirgwin et al., *Biochemistry*, 18, 5294-5299 (1979). cDNA is then synthesized from the mRNA using reverse transcriptase (for example, Moloney MLV reverse transcriptase available from Gibco/BRL, Bethesda, MD, or AMV reverse transcriptase available from Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL).

An isolated nucleic acid molecule of the invention which is RNA can be isolated by cloning a cDNA encoding a KLK15 Related Protein into an appropriate vector which allows for transcription of the cDNA to produce an RNA molecule which encodes a KLK15 Related Protein. For example, a cDNA can be cloned downstream of a bacteriophage promoter, (e.g. a T7 promoter) in a vector, cDNA can be transcribed *in vitro* with T7 polymerase, and the resultant RNA can be isolated by conventional techniques.

Nucleic acid molecules of the invention may be chemically synthesized using standard techniques. Methods of chemically synthesizing polydeoxynucleotides are known, including but not limited to solid-phase synthesis which, like peptide synthesis, has been fully automated in commercially available DNA synthesizers (See e.g., Itakura et al. U.S. Patent No. 4,598,049; Caruthers et al. U.S. Patent No. 4,458,066; and Itakura U.S. Patent Nos. 4,401,796 and 4,373,071).

Determination of whether a particular nucleic acid molecule encodes a KLK15 Related Protein can be accomplished by expressing the cDNA in an appropriate host cell by standard techniques, and testing the expressed protein in the methods described herein. A cDNA encoding a KLK15 Related Protein can be sequenced by standard techniques, such as dideoxynucleotide chain termination or Maxam-Gilbert chemical sequencing, to determine the nucleic acid sequence and the predicted amino acid sequence of the encoded protein.

The initiation codon and untranslated sequences of a KLK15 Related Protein may be determined using computer software designed for the purpose, such as PC/Gene (IntelliGenetics Inc., Calif.). The intron-exon structure and the transcription regulatory sequences of a gene encoding a KLK15 Related Protein may be confirmed by using a nucleic acid molecule of the invention encoding a KLK15 Related Protein to probe a

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 10 -

genomic DNA clone library. Regulatory elements can be identified using standard techniques. The function of the elements can be confirmed by using these elements to express a reporter gene such as the lacZ gene that is operatively linked to the elements. These constructs may be introduced into cultured cells using conventional procedures or into non-human transgenic animal models. In addition to identifying regulatory elements in DNA, such constructs may also be used to identify nuclear proteins interacting with the elements, using techniques known in the art. In an embodiment, regulatory sequences of a nucleic acid molecule of the invention comprise the sequence of SEQ ID NO.11.

In a particular embodiment of the invention, the nucleic acid molecules isolated using the methods described herein are mutant KLK15 gene alleles. The mutant alleles may be isolated from individuals either known or proposed to have a genotype which contributes to the symptoms of a disorder involving a KLK15 Related Protein. Mutant alleles and mutant allele products may be used in therapeutic and diagnostic methods described herein. For example, a cDNA of a mutant KLK15 gene may be isolated using PCR as described herein, and the DNA sequence of the mutant allele may be compared to the normal allele to ascertain the mutation(s) responsible for the loss or alteration of function of the mutant gene product. A genomic library can also be constructed using DNA from an individual suspected of or known to carry a mutant allele, or a cDNA library can be constructed using RNA from tissue known, or suspected to express the mutant allele. A nucleic acid encoding a normal KLK15 gene or any suitable fragment thereof, may then be labeled and used as a probe to identify the corresponding mutant allele in such libraries. Clones containing mutant sequences can be purified and subjected to sequence analysis. In addition, an expression library can be constructed using cDNA from RNA isolated from a tissue of an individual known or suspected to express a mutant KLK15 allele. Gene products made by the putatively mutant tissue may be expressed and screened, for example using antibodies specific for a KLK15 Related Protein as described herein. Library clones identified using the antibodies can be purified and subjected to sequence analysis.

The sequence of a nucleic acid molecule of the invention, or a fragment of the molecule, may be inverted relative to its normal presentation for transcription to produce an antisense nucleic acid molecule. An antisense nucleic acid molecule may be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures known in the art.

2. Proteins of the Invention

An amino acid sequence of a KLK15 Protein comprises a sequence as shown in SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9. The protein is primarily expressed in the thyroid gland, and to a lower extent in the prostate, salivary and adrenal glands, colon, testis, and kidney.

In addition to proteins comprising an amino acid sequence as shown in SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9 the proteins of the present invention include truncations of a KLK15 Protein, analogs of a KLK15 Protein, and proteins having sequence identity or similarity to a KLK15 Protein, and truncations thereof as described herein (i.e. KLK15 Related Proteins).

Truncated proteins may comprise peptides of between 3 and 70 amino acid residues, ranging in size from a tripeptide to a 70 mer polypeptide. In a preferred embodiment the peptide is HNEPGTAG (SEQ ID NO

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 11 -

10) The truncated proteins may have an amino group (-NH₂), a hydrophobic group (for example, carbobenzoxy, dansyl, or T-butyloxycarbonyl), an acetyl group, a 9-fluorenylmethoxy-carbonyl (FMOC) group, or a macromolecule including but not limited to lipid-fatty acid conjugates, polyethylene glycol, or carbohydrates at the amino terminal end. The truncated proteins may have a carboxyl group, an amido group, a T-butyloxycarbonyl group, or a macromolecule including but not limited to lipid-fatty acid conjugates, polyethylene glycol, or carbohydrates at the carboxy terminal end.

The proteins of the invention may also include analogs of a KLK15 Protein, and/or truncations thereof as described herein, which may include, but are not limited to a KLK15 protein, containing one or more amino acid substitutions, insertions, and/or deletions. Amino acid substitutions may be of a conserved or non-conserved nature. Conserved amino acid substitutions involve replacing one or more amino acids of a KLK15 Protein amino acid sequence with amino acids of similar charge, size, and/or hydrophobicity characteristics. When only conserved substitutions are made the resulting analog is preferably functionally equivalent to a KLK15 Protein. Non-conserved substitutions involve replacing one or more amino acids of the KLK15 Protein amino acid sequence with one or more amino acids that possess dissimilar charge, size, and/or hydrophobicity characteristics.

One or more amino acid insertions may be introduced into a KLK15 Protein. Amino acid insertions may consist of single amino acid residues or sequential amino acids ranging from 2 to 15 amino acids in length.

Deletions may consist of the removal of one or more amino acids, or discrete portions from a KLK15 Protein sequence. The deleted amino acids may or may not be contiguous. The lower limit length of the resulting analog with a deletion mutation is about 10 amino acids, preferably 20 to 40 amino acids.

The proteins of the invention include proteins with sequence identity or similarity to a KLK15 Protein and/or truncations thereof as described herein. Such KLK15 Proteins include proteins whose amino acid sequences are comprised of the amino acid sequences of KLK15 Protein regions from other species that hybridize under selected hybridization conditions (see discussion of stringent hybridization conditions herein) with a probe used to obtain a KLK15 Protein. These proteins will generally have the same regions which are characteristic of a KLK15 Protein. Preferably a protein will have substantial sequence identity for example, about 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, or 85% identity, preferably 90% identity, more preferably at least 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity, and most preferably 98% identity with an amino acid sequence of SEQ.ID.NO. 6, 7, 8, or 9. A percent amino acid sequence homology, similarity or identity is calculated as the percentage of aligned amino acids that match the reference sequence using known methods as described herein.

The invention also contemplates isoforms of the proteins of the invention. An isoform contains the same number and kinds of amino acids as a protein of the invention, but the isoform has a different molecular structure. Isoforms contemplated by the present invention preferably have the same properties as a protein of the invention as described herein.

The present invention also includes KLK15 Related Proteins conjugated with a selected protein, or a marker protein (see below) to produce fusion proteins. Additionally, immunogenic portions of a KLK15 Protein and a KLK15 Protein Related Protein are within the scope of the invention.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 12 -

A KLK15 Related Protein of the invention may be prepared using recombinant DNA methods. Accordingly, the nucleic acid molecules of the present invention having a sequence which encodes a KLK15 Related Protein of the invention may be incorporated in a known manner into an appropriate expression vector which ensures good expression of the protein. Possible expression vectors include but are not limited to cosmids, plasmids, or modified viruses (e.g. replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), so long as the vector is compatible with the host cell used.

The invention therefore contemplates a recombinant expression vector of the invention containing a nucleic acid molecule of the invention, and the necessary regulatory sequences for the transcription and translation of the inserted protein-sequence. Suitable regulatory sequences may be derived from a variety of sources, including bacterial, fungal, viral, mammalian, or insect genes [For example, see the regulatory sequences described in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)]. Selection of appropriate regulatory sequences is dependent on the host cell chosen as discussed below, and may be readily accomplished by one of ordinary skill in the art. The necessary regulatory sequences may be supplied by the native KLK15 Protein and/or its flanking regions.

The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA nucleic acid molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is linked to a regulatory sequence in a manner which allows for expression, by transcription of the DNA molecule, of an RNA molecule which is antisense to the nucleic acid sequence of a protein of the invention or a fragment thereof. Regulatory sequences linked to the antisense nucleic acid can be chosen which direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance a viral promoter and/or enhancer, or regulatory sequences can be chosen which direct tissue or cell type specific expression of antisense RNA.

The recombinant expression vectors of the invention may also contain a marker gene which facilitates the selection of host cells transformed or transfected with a recombinant molecule of the invention. Examples of marker genes are genes encoding a protein such as G418 and hygromycin which confer resistance to certain drugs, β -galactosidase, chloramphenicol acetyltransferase, firefly luciferase, or an immunoglobulin or portion thereof such as the Fc portion of an immunoglobulin, preferably IgG. The markers can be introduced on a separate vector from the nucleic acid of interest.

The recombinant expression vectors may also contain genes that encode a fusion moiety which provides increased expression of the recombinant protein; increased solubility of the recombinant protein; and aid in the purification of the target recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. For example, a proteolytic cleavage site may be added to the target recombinant protein to allow separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Typical fusion expression vectors include pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the recombinant protein.

The recombinant expression vectors may be introduced into host cells to produce a transformant host

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 13 -

cell. "Transformant host cells" include host cells which have been transformed or transfected with a recombinant expression vector of the invention. The terms "transformed with", "transfected with", "transformation" and "transfection" encompass the introduction of a nucleic acid (e.g. a vector) into a cell by one of many standard techniques. Prokaryotic cells can be transformed with a nucleic acid by, for example, electroporation or calcium-chloride mediated transformation. A nucleic acid can be introduced into mammalian cells via conventional techniques such as calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofectin, electroporation or microinjection. Suitable methods for transforming and transfecting host cells can be found in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)), and other laboratory textbooks.

Suitable host cells include a wide variety of prokaryotic and eukaryotic host cells. For example, the proteins of the invention may be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus), yeast cells, or mammalian cells. Other suitable host cells can be found in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991).

A host cell may also be chosen which modulates the expression of an inserted nucleic acid sequence, or modifies (e.g. glycosylation or phosphorylation) and processes (e.g. cleaves) the protein in a desired fashion. Host systems or cell lines may be selected which have specific and characteristic mechanisms for post-translational processing and modification of proteins. For example, eukaryotic host cells including CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, and WI38 may be used. For long-term high-yield stable expression of the protein, cell lines and host systems which stably express the gene product may be engineered.

Host cells and in particular cell lines produced using the methods described herein may be particularly useful in screening and evaluating compounds that modulate the activity of a KLK15 Related Protein.

The proteins of the invention may also be expressed in non-human transgenic animals including but not limited to mice, rats, rabbits, guinea pigs, micro-pigs, goats, sheep, pigs, non-human primates (e.g. baboons, monkeys, and chimpanzees) [see Hammer et al. (Nature 315:680-683, 1985), Palmiter et al. (Science 222:809-814, 1983), Brinster et al. (Proc Natl. Acad. Sci USA 82:44384442, 1985), Palmiter and Brinster (Cell. 41:343-345, 1985) and U.S. Patent No. 4,736,866]. Procedures known in the art may be used to introduce a nucleic acid molecule of the invention encoding a KLK15 Related Protein into animals to produce the founder lines of transgenic animals. Such procedures include pronuclear microinjection, retrovirus mediated gene transfer into germ lines, gene targeting in embryonic stem cells, electroporation of embryos, and sperm-mediated gene transfer.

The present invention contemplates a transgenic animal that carries the KLK15 gene in all their cells, and animals which carry the transgene in some but not all their cells. The transgene may be integrated as a single transgene or in concatamers. The transgene may be selectively introduced into and activated in specific cell types (See for example, Lasko et al, 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6236). The transgene may be integrated into the chromosomal site of the endogenous gene by gene targeting. The transgene may be selectively introduced into a particular cell type inactivating the endogenous gene in that cell type (See Gu et al Science 265: 103-106).

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 14 -

The expression of a recombinant KLK15 Related Protein in a transgenic animal may be assayed using standard techniques. Initial screening may be conducted by Southern Blot analysis, or PCR methods to analyze whether the transgene has been integrated. The level of mRNA expression in the tissues of transgenic animals may also be assessed using techniques including Northern blot analysis of tissue samples, *in situ* hybridization, and RT-PCR. Tissue may also be evaluated immunocytochemically using antibodies against KLK15 Protein.

Proteins of the invention may also be prepared by chemical synthesis using techniques well known in the chemistry of proteins such as solid phase synthesis (Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85:2149-2154) or synthesis in homogenous solution (Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I and II, Thieme, Stuttgart).

N-terminal or C-terminal fusion proteins comprising a KLK15 Related Protein of the invention conjugated with other molecules, such as proteins, may be prepared by fusing, through recombinant techniques, the N-terminal or C-terminal of a KLK15 Related Protein, and the sequence of a selected protein or marker protein with a desired biological function. The resultant fusion proteins contain a KLK15 Protein fused to the selected protein or marker protein as described herein. Examples of proteins which may be used to prepare fusion proteins include immunoglobulins, glutathione-S-transferase (GST), hemagglutinin (HA), and truncated myc.

3. Antibodies

KLK15 Related Proteins of the invention can be used to prepare antibodies specific for the proteins. Antibodies can be prepared which bind a distinct epitope in an unconserved region of the protein. An unconserved region of the protein is one that does not have substantial sequence homology to other proteins. A region from a conserved region such as a well-characterized domain can also be used to prepare an antibody to a conserved region of a KLK15 Related Protein. Antibodies having specificity for a KLK15 Related Protein may also be raised from fusion proteins created by expressing fusion proteins in bacteria as described herein.

The invention can employ intact monoclonal or polyclonal antibodies, and immunologically active fragments (e.g. a Fab, (Fab)₂ fragment, or Fab expression library fragments and epitope-binding fragments thereof), an antibody heavy chain, and antibody light chain, a genetically engineered single chain Fv molecule (Ladner et al, U.S. Pat. No. 4,946,778), humanized antibody, or a chimeric antibody, for example, an antibody which contains the binding specificity of a murine antibody, but in which the remaining portions are of human origin. Antibodies including monoclonal and polyclonal antibodies, fragments and chimeras, may be prepared using methods known to those skilled in the art.

4. Applications of the Nucleic Acid Molecules, KLK15 Related Proteins, and Antibodies of the Invention

The nucleic acid molecules, KLK15 Related Proteins, and antibodies of the invention may be used in the prognostic and diagnostic evaluation of disorders involving a KLK15 Related Protein (e.g. cancer or thyroid disorders), and the identification of subjects with a predisposition to such disorders (Section 4.1.1 and 4.1.2).

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 15 -

In an embodiment of the invention, a method is provided for detecting the expression of the cancer marker KLK15 in a patient comprising:

- (a) taking a sample derived from a patient; and
- (b) detecting in the sample a nucleic acid sequence encoding KLK15 or a protein product encoded by a KLK15 nucleic acid sequence.

In a particular embodiment of the invention, the nucleic acid molecules, KLK15 Related Proteins, and antibodies of the invention may be used in the diagnosis and staging of cancer, in particular prostate cancer. Increased levels of KLK15 Related Proteins are associated with more aggressive forms of prostate cancer and may be an indicator of poor prognosis.

- Methods for detecting nucleic acid molecules and KLK15 Related Proteins of the invention, can be used to monitor disorders involving a KLK15 Related Protein by detecting KLK15 Related Proteins and nucleic acid molecules encoding KLK15 Related Proteins. The applications of the present invention also include methods for the identification of compounds that modulate the biological activity of KLK15 Related Proteins (Section 4.2). The compounds, antibodies etc. may be used for the treatment of disorders involving a KLK15 Related Protein (Section 4.3). It would also be apparent to one skilled in the art that the methods described herein may be used to study the developmental expression of KLK15 Related Proteins and, accordingly, will provide further insight into the role of KLK15 Related Proteins.

4.1 Diagnostic Methods

- A variety of methods can be employed for the diagnostic and prognostic evaluation of disorders involving a KLK15 Related Protein, and the identification of subjects with a predisposition to such disorders. Such methods may, for example, utilize nucleic acid molecules of the invention, and fragments thereof, and antibodies directed against KLK15 Related Proteins, including peptide fragments. In particular, the nucleic acids and antibodies may be used, for example, for: (1) the detection of the presence of KLK15 mutations, or the detection of either over- or under-expression of KLK15 mRNA relative to a non-disorder state or the qualitative or quantitative detection of alternatively spliced forms of KLK15 transcripts which may correlate with certain conditions or susceptibility toward such conditions; and (2) the detection of either an over- or an under-abundance of KLK15 Related Proteins relative to a non-disorder state or the presence of a modified (e.g., less than full length) KLK15 Protein which correlates with a disorder state, or a progression toward a disorder state.

- The methods described herein may be used to evaluate the probability of the presence of malignant or pre-malignant cells, for example, in a group of cells freshly removed from a host. Such methods can be used to detect tumors, quantitate their growth, and help in the diagnosis and prognosis of disease. The methods can be used to detect the presence of cancer metastasis, as well as confirm the absence or removal of all tumor tissue following surgery, cancer chemotherapy, and/or radiation therapy. They can further be used to monitor cancer chemotherapy and tumor reappearance.

The methods described herein may be performed by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one specific KLK15 nucleic acid or antibody described herein, which may be conveniently used, e.g.,

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 16 -

in clinical settings, to screen and diagnose patients and to screen and identify those individuals exhibiting a predisposition to developing a disorder.

Nucleic acid-based detection techniques are described, below, in Section 4.1.1. Peptide detection techniques are described, below, in Section 4.1.2. The samples that may be analyzed using the methods of the invention include those which are known or suspected to express KLK15 or contain KLK15 Related Proteins. The samples may be derived from a patient or a cell culture, and include but are not limited to biological fluids, tissue extracts, freshly harvested cells, and lysates of cells which have been incubated in cell cultures.

Oligonucleotides or longer fragments derived from any of the nucleic acid molecules of the invention may be used as targets in a microarray. The microarray can be used to simultaneously monitor the expression levels of large numbers of genes and to identify genetic variants, mutations, and polymorphisms. The information from the microarray may be used to determine gene function, to understand the genetic basis of a disorder, to diagnose a disorder, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents.

The preparation, use, and analysis of microarrays are well known to a person skilled in the art. (See, for example, Brennan, T. M. et al. (1995) U.S. Pat. No. 5,474,796; Schena, et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619; Baldeschweiler et al. (1995), PCT Application WO95/251116; Shalon, D. et al. (1995) PCT application WO95/35505; Heller, R. A. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2150-2155; and Heller, M. J. et al. (1997) U.S. Pat. No. 5,605,662.)

4.1.1 Methods for Detecting Nucleic Acid Molecules of the Invention

The nucleic acid molecules of the invention allow those skilled in the art to construct nucleotide probes for use in the detection of nucleic acid sequences of the invention in samples. Suitable probes include nucleic acid molecules based on nucleic acid sequences encoding at least 5 sequential amino acids from regions of the KLK15 Protein, preferably they comprise 15 to 30 nucleotides (see SEQ ID Nos. 47-50). A nucleotide probe may be labeled with a detectable substance such as a radioactive label which provides for an adequate signal and has sufficient half-life such as ^{32}P , ^3H , ^{14}C or the like. Other detectable substances which may be used include antigens that are recognized by a specific labeled antibody, fluorescent compounds, enzymes, antibodies specific for a labeled antigen, and luminescent compounds. An appropriate label may be selected having regard to the rate of hybridization and binding of the probe to the nucleotide to be detected and the amount of nucleotide available for hybridization. Labeled probes may be hybridized to nucleic acids on solid supports such as nitrocellulose filters or nylon membranes as generally described in Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.). The nucleic acid probes may be used to detect genes, preferably in human cells, that encode KLK15 Related Proteins. The nucleotide probes may also be useful in the diagnosis of disorders involving a KLK15 Related Protein; in monitoring the progression of such disorders; or monitoring a therapeutic treatment.

The probe may be used in hybridization techniques to detect genes that encode KLK15 Related Proteins. The technique generally involves contacting and incubating nucleic acids (e.g. recombinant DNA molecules, cloned genes) obtained from a sample from a patient or other cellular source with a probe of the present invention under conditions favorable for the specific annealing of the probes to complementary

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 17 -

sequences in the nucleic acids. After incubation, the non-annealed nucleic acids are removed, and the presence of nucleic acids that have hybridized to the probe if any are detected.

The detection of nucleic acid molecules of the invention may involve the amplification of specific gene sequences using an amplification method such as PCR, followed by the analysis of the amplified molecules using techniques known to those skilled in the art. Suitable primers can be routinely designed by one of skill in the art.

Genomic DNA may be used in hybridization or amplification assays of biological samples to detect abnormalities involving KLK15 structure, including point mutations, insertions, deletions, and chromosomal rearrangements. For example, direct sequencing, single stranded conformational polymorphism analyses, heteroduplex analysis, denaturing gradient gel electrophoresis, chemical mismatch cleavage, and oligonucleotide hybridization may be utilized.

Genotyping techniques known to one skilled in the art can be used to type polymorphisms that are in close proximity to the mutations in a *klk15* gene. The polymorphisms may be used to identify individuals in families that are likely to carry mutations. If a polymorphism exhibits linkage disequilibrium with mutations in a KLK15 gene, it can also be used to screen for individuals in the general population likely to carry mutations. Polymorphisms which may be used include restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), single-base polymorphisms, and simple sequence repeat polymorphisms (SSLPs).

A probe of the invention may be used to directly identify RFLPs. A probe or primer of the invention can additionally be used to isolate genomic clones such as YACs, BACs, PACs, cosmids, phage or plasmids. The DNA in the clones can be screened for SSLPs using hybridization or sequencing procedures.

Hybridization and amplification techniques described herein may be used to assay qualitative and quantitative aspects of *klk15* expression. For example, RNA may be isolated from a cell type or tissue known to express *klk15* and tested utilizing the hybridization (e.g. standard Northern analyses) or PCR techniques referred to herein. The techniques may be used to detect differences in transcript size which may be due to normal or abnormal alternative splicing. The techniques may be used to detect quantitative differences between levels of full length and/or alternatively splice transcripts detected in normal individuals relative to those individuals exhibiting symptoms of a disorder involving a KLK15 Related Protein.

The primers and probes may be used in the above described methods *in situ* i.e. directly on tissue sections (fixed and/or frozen) of patient tissue obtained from biopsies or resections.

4.1.2 Methods for Detecting KLK15 Related Proteins

Antibodies specifically reactive with a KLK15 Related Protein, or derivatives, such as enzyme conjugates or labeled derivatives, may be used to detect KLK15 Related Proteins in various samples (e.g. biological materials). They may be used as diagnostic or prognostic reagents and they may be used to detect abnormalities in the level of KLK15 Related Protein expression, or abnormalities in the structure, and/or temporal, tissue, cellular, or subcellular location of a KLK15 Related Protein. Antibodies may also be used to screen potentially therapeutic compounds *in vitro* to determine their effects on disorders involving a KLK15 Related Protein, and other conditions. *In vitro* immunoassays may also be used to assess or monitor the efficacy

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 18 -

of particular therapies. The antibodies of the invention may also be used *in vitro* to determine the level of KLK15 expression in cells genetically engineered to produce a KLK15 Related Protein.

The antibodies may be used in any known immunoassays which rely on the binding interaction between an antigenic determinant of a KLK15 Related Protein and the antibodies. Examples of such assays are radioimmunoassays, enzyme immunoassays (e.g. ELISA), immunofluorescence, immunoprecipitation, latex agglutination, hemagglutination, and histochemical tests. The antibodies may be used to detect and quantify KLK15 Related Proteins in a sample in order to determine its role in particular cellular events or pathological states, and to diagnose and treat such pathological states.

In particular, the antibodies of the invention may be used in immuno-histochemical analyses, for example, at the cellular and sub-subcellular level, to detect a KLK15 Related Protein, to localize it to particular cells and tissues, and to specific subcellular locations, and to quantitate the level of expression.

Cytochemical techniques known in the art for localizing antigens using light and electron microscopy may be used to detect a KLK15 Related Protein. Generally, an antibody of the invention may be labeled with a detectable substance and a KLK15 Related Protein may be localised in tissues and cells based upon the presence of the detectable substance. Examples of detectable substances include, but are not limited to, the following: radioisotopes (e.g., ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I), fluorescent labels (e.g., FITC, rhodamine, lanthanide phosphors), luminescent labels such as luminol; enzymatic labels (e.g., horseradish peroxidase, beta-galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase, acetylcholinesterase), biotinyl groups (which can be detected by marked avidin e.g., streptavidin containing a fluorescent marker or enzymatic activity that can be detected by optical or calorimetric methods), predetermined polypeptide epitopes recognized by a secondary reporter (e.g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags). In some embodiments, labels are attached via spacer arms of various lengths to reduce potential steric hindrance. Antibodies may also be coupled to electron dense substances, such as ferritin or colloidal gold, which are readily visualised by electron microscopy.

The antibody or sample may be immobilized on a carrier or solid support which is capable of immobilizing cells, antibodies etc. For example, the carrier or support may be nitrocellulose, or glass, polyacrylamides, gabbros, and magnetite. The support material may have any possible configuration including spherical (e.g. bead), cylindrical (e.g. inside surface of a test tube or well, or the external surface of a rod), or flat (e.g. sheet, test strip). Indirect methods may also be employed in which the primary antigen-antibody reaction is amplified by the introduction of a second antibody, having specificity for the antibody reactive against KLK15 Related Protein. By way of example, if the antibody having specificity a KLK15 Related Protein is a rabbit IgG antibody, the second antibody may be goat anti-rabbit gamma-globulin labeled with a detectable substance as described herein.

Where a radioactive label is used as a detectable substance, a KLK15 Related Protein may be localized by radioautography. The results of radioautography may be quantitated by determining the density of particles in the radioautographs by various optical methods, or by counting the grains.

In an embodiment, the invention contemplates a method for monitoring the progression of cancer (e.g.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 19 -

prostate cancer) in an individual, comprising:

- (a) contacting an amount of an antibody which binds to a KLK15 Related Protein, with a sample from the individual so as to form a binary complex comprising the antibody and KLK15 Related Protein in the sample;
- 5 (b) determining or detecting the presence or amount of complex formation in the sample;
- (c) repeating steps (a) and (b) at a point later in time; and
- (d) comparing the result of step (b) with the result of step (c), wherein a difference in the amount of complex formation is indicative of the progression of the cancer in said individual.

The amount of complexes may also be compared to a value representative of the amount of the complexes from an individual not at risk of, or afflicted with, cancer (e.g. prostate cancer).

4.2 Methods for Identifying or Evaluating Substances/Compounds

The methods described herein are designed to identify substances that modulate the biological activity of a KLK15 Related Protein including substances that bind to KLK15 Related Proteins, or bind to other proteins that interact with a KLK15 Related Protein, to compounds that interfere with, or enhance the interaction of a KLK15 Related Protein and substances that bind to the KLK15 Related Protein or other proteins that interact with a KLK15 Related Protein. Methods are also utilized that identify compounds that bind to KLK15 regulatory sequences.

The substances and compounds identified using the methods of the invention include but are not limited to peptides such as soluble peptides including Ig-tailed fusion peptides, members of random peptide libraries and combinatorial chemistry-derived molecular libraries made of D- and/or L-configuration amino acids, phosphopeptides (including members of random or partially degenerate, directed phosphopeptide libraries), antibodies [e.g. polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric, single chain antibodies, fragments, (e.g. Fab, F(ab)₂, and Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments thereof)], and small organic or inorganic molecules. The substance or compound may be an endogenous physiological compound or it may be a natural or synthetic compound.

Substances which modulate a KLK15 Related Protein can be identified based on their ability to bind to a KLK15 Related Protein. Therefore, the invention also provides methods for identifying substances which bind to a KLK15 Related Protein. Substances identified using the methods of the invention may be isolated, cloned and sequenced using conventional techniques. A substance that associates with a polypeptide of the invention may be an agonist or antagonist of the biological or immunological activity of a polypeptide of the invention.

The term "agonist", refers to a molecule that increases the amount of, or prolongs the duration of, the activity of the protein. The term "antagonist" refers to a molecule which decreases the biological or immunological activity of the protein. Agonists and antagonists may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, or any other molecules that associate with a protein of the invention.

Substances which can bind with a KLK15 Related Protein may be identified by reacting a KLK15 Related Protein with a test substance which potentially binds to a KLK15 Related Protein, under conditions

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 20 -

which permit the formation of substance-KLK15 Related Protein complexes and removing and/or detecting the complexes. The complexes can be detected by assaying for substance-KLK15 Related Protein complexes, for free substance, or for non-complexed KLK15 Related Protein. Conditions which permit the formation of substance-KLK15 Related Protein complexes may be selected having regard to factors such as the nature and amounts of the substance and the protein.

5 The substance-protein complex, free substance or non-complexed proteins may be isolated by conventional isolation techniques, for example, salting out, chromatography, electrophoresis, gel filtration, fractionation, absorption, polyacrylamide gel electrophoresis, agglutination, or combinations thereof. To facilitate the assay of the components, antibody against KLK15 Related Protein or the substance, or labeled
10 KLK15 Related Protein, or a labeled substance may be utilized. The antibodies, proteins, or substances may be labeled with a detectable substance as described above.

A KLK15 Related Protein, or the substance used in the method of the invention may be insolubilized. For example, a KLK15 Related Protein, or substance may be bound to a suitable carrier such as agarose, cellulose, dextran, Sephadex, Sepharose, carboxymethyl cellulose polystyrene, filter paper, ion-exchange resin,
15 plastic film, plastic tube, glass beads, polyamine-methyl vinyl-ether-maleic acid copolymer, amino acid copolymer, ethylene-maleic acid copolymer, nylon, silk, etc. The carrier may be in the shape of, for example, a tube, test plate, beads, disc, sphere etc. The insolubilized protein or substance may be prepared by reacting the material with a suitable insoluble carrier using known chemical or physical methods, for example, cyanogen bromide coupling.

20 The invention also contemplates a method for evaluating a compound for its ability to modulate the biological activity of a KLK15 Related Protein of the invention, by assaying for an agonist or antagonist (i.e. enhancer or inhibitor) of the binding of a KLK15 Related Protein with a substance which binds with a KLK15 Related Protein. The basic method for evaluating if a compound is an agonist or antagonist of the binding of a KLK15 Related Protein and a substance that binds to the protein, is to prepare a reaction mixture containing
25 the KLK15 Related Protein and the substance under conditions which permit the formation of substance-KLK15 Related Protein complexes, in the presence of a test compound. The test compound may be initially added to the mixture, or may be added subsequent to the addition of the KLK15 Related Protein and substance. Control reaction mixtures without the test compound or with a placebo are also prepared. The formation of complexes is detected and the formation of complexes in the control reaction but not in the reaction mixture indicates that the test compound interferes with the interaction of the KLK15 Related Protein and substance.
30 The reactions may be carried out in the liquid phase or the KLK15 Related Protein, substance, or test compound may be immobilized as described herein. The ability of a compound to modulate the biological activity of a KLK15 Related Protein of the invention may be tested by determining the biological effects on cells.

35 It will be understood that the agonists and antagonists i.e. inhibitors and enhancers that can be assayed using the methods of the invention may act on one or more of the binding sites on the protein or substance including agonist binding sites, competitive antagonist binding sites, non-competitive antagonist binding sites

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 21 -

or allosteric sites.

The invention also makes it possible to screen for antagonists that inhibit the effects of an agonist of the interaction of KLK15 Related Protein with a substance which is capable of binding to the KLK15 Related Protein. Thus, the invention may be used to assay for a compound that competes for the same binding site of a KLK15 Related Protein.

The invention also contemplates methods for identifying compounds that bind to proteins that interact with a KLK15 Related Protein. Protein-protein interactions may be identified using conventional methods such as co-immunoprecipitation, crosslinking and co-purification through gradients or chromatographic columns. Methods may also be employed that result in the simultaneous identification of genes which encode proteins interacting with a KLK15 Related Protein. These methods include probing expression libraries with labeled KLK15 Related Protein.

Two-hybrid systems may also be used to detect protein interactions *in vivo*. Generally, plasmids are constructed that encode two hybrid proteins. A first hybrid protein consists of the DNA-binding domain of a transcription activator protein fused to a KLK15 Related Protein, and the second hybrid protein consists of the transcription activator protein's activator domain fused to an unknown protein encoded by a cDNA which has been recombined into the plasmid as part of a cDNA library. The plasmids are transformed into a strain of yeast (e.g. *S. cerevisiae*) that contains a reporter gene (e.g. lacZ, luciferase, alkaline phosphatase, horseradish peroxidase) whose regulatory region contains the transcription activator's binding site. The hybrid proteins alone cannot activate the transcription of the reporter gene. However, interaction of the two hybrid proteins reconstitutes the functional activator protein and results in expression of the reporter gene, which is detected by an assay for the reporter gene product.

It will be appreciated that fusion proteins may be used in the above-described methods. In particular, KLK15 Related Proteins fused to a glutathione-S-transferase may be used in the methods.

A modulator of a KLK15 Related Protein of the invention may also be identified based on its ability to inhibit or enhance catalytic activity of the protein.

The reagents suitable for applying the methods of the invention to evaluate compounds that modulate a KLK15 Related Protein may be packaged into convenient kits providing the necessary materials packaged into suitable containers. The kits may also include suitable supports useful in performing the methods of the invention.

4.3 Compositions and Treatments

The proteins of the invention, substances or compounds identified by the methods described herein, antibodies, and nucleic acid molecules of the invention may be used for modulating the biological activity of a KLK15 Related Protein, and they may be used in the treatment of conditions such as cancer (particularly thyroid, prostate, colon, kidney, testicular cancer) and thyroid disorders in a patient.

Accordingly, the substances, antibodies, peptides, and compounds may be formulated into pharmaceutical compositions for administration to subjects in a biologically compatible form suitable for administration *in vivo*. By "biologically compatible form suitable for administration *in vivo*" is meant a form

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 22 -

- of the active substance to be administered in which any toxic effects are outweighed by the therapeutic effects. The active substances may be administered to living organisms including humans and animals. Administration of a therapeutically active amount of a pharmaceutical composition of the present invention is defined as an amount effective, at dosages and for periods of time necessary to achieve the desired result. For example, a therapeutically active amount of a substance may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of antibody to elicit a desired response in the individual. Dosage regimens may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several divided doses may be administered daily or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.
- The active substance may be administered in a convenient manner such as by injection (subcutaneous, intravenous, etc.), oral administration, inhalation, transdermal application, or rectal administration. Depending on the route of administration, the active substance may be coated in a material to protect the substance from the action of enzymes, acids and other natural conditions that may inactivate the substance.
- The compositions described herein can be prepared by per se known methods for the preparation of pharmaceutically acceptable compositions which can be administered to subjects, such that an effective quantity of the active substance is combined in a mixture with a pharmaceutically acceptable vehicle. Suitable vehicles are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985). On this basis, the compositions include, albeit not exclusively, solutions of the active substances in association with one or more pharmaceutically acceptable vehicles or diluents, and contained in buffered solutions with a suitable pH and iso-osmotic with the physiological fluids.
- The compositions are indicated as therapeutic agents either alone or in conjunction with other therapeutic agents or other forms of treatment (e.g. chemotherapy or radiotherapy). For example, the compositions may be used in combination with anti-proliferative agents, antimicrobial agents, immunostimulatory agents, or anti-inflammatories. In particular, the compounds may be used in combination with anti-viral and/or anti-proliferative agents. The compositions of the invention may be administered concurrently, separately, or sequentially with other therapeutic agents or therapies.
- Vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may be used to deliver nucleic acid molecules to a targeted organ, tissue, or cell population. Methods well known to those skilled in the art may be used to construct recombinant vectors which will express antisense nucleic acid molecules of the invention. (See, for example, the techniques described in Sambrook et al (supra) and Ausubel et al (supra)).
- The nucleic acid molecules comprising full length cDNA sequences and/or their regulatory elements enable a skilled artisan to use sequences encoding a protein of the invention as an investigative tool in sense (Yousoufian H and H F Lodish 1993 Mol Cell Biol 13:98-104) or antisense (Eguchi et al (1991) Annu Rev Biochem 60:631-652) regulation of gene function. Such technology is well known in the art, and sense or antisense oligomers, or larger fragments, can be designed from various locations along the coding or control

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 23 -

regions.

Genes encoding a protein of the invention can be turned off by transfecting a cell or tissue with vectors which express high levels of a desired KLK15-encoding fragment. Such constructs can inundate cells with untranslatable sense or antisense sequences. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors may continue to transcribe RNA molecules until all copies are disabled by endogenous nucleases.

Modifications of gene expression can be obtained by designing antisense molecules, DNA, RNA or PNA, to the regulatory regions of a gene encoding a protein of the invention, i.e., the promoters, enhancers, and introns. Preferably, oligonucleotides are derived from the transcription initiation site, eg, between -10 and +10 regions of the leader sequence. The antisense molecules may also be designed so that they block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes. Inhibition may also be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing compromises the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules. Therapeutic advances using triplex DNA were reviewed by Gee J E et al (In: Huber B E and B I Carr (1994) Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co, Mt Kisco N.Y.).

Ribozymes are enzymatic RNA molecules that catalyze the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. The invention therefore contemplates engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of sequences encoding a protein of the invention.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target may initially be identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences, GUA, GUU and GUC. Once the sites are identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site may be evaluated for secondary structural features which may render the oligonucleotide inoperable. The suitability of candidate targets may also be determined by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

Methods for introducing vectors into cells or tissues include those methods discussed herein and which are suitable for *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* therapy. For *ex vivo* therapy, vectors may be introduced into stem cells obtained from a patient and clonally propagated for autologous transplant into the same patient (See U.S. Pat. Nos. 5,399,493 and 5,437,994). Delivery by transfection and by liposome are well known in the art.

An antibody against a KLK15 Related Protein may be conjugated to chemotherapeutic drugs, toxins, immunological response modifiers, hematogenous agents, enzymes, and radioisotopes and used in the prevention and treatment of cancer (e.g. thyroid, prostate, colon, kidney, testicular cancer). For example, an antibody against a KLK15 Related Protein may be conjugated to toxic moieties including but not limited to ricin A, diphtheria toxin, abrin, modeccin, or bacterial toxins from *Pseudomonas* or *Shigella*. Toxins and their derivatives have been reported to form conjugates with antibodies specific to particular target tissues, such as cancer or tumor cells in order to obtain specifically targeted cellular toxicity (Moolten F.L. et al, Immun. Rev.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 24 -

62:47-72, 1982, and Bernhard, M.I. Cancer Res. 43:4420, 1983).

Conjugates can be prepared by standard means known in the art. A number of bifunctional linking agents (e.g. heterobifunctional linkers such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate) are available commercially from Pierce Chemically Company, Rockford, Ill.

5 Administration of the antibodies or immunotoxins for therapeutic use may be by an intravenous route, although with proper formulation additional routes of administration such as intraperitoneal, oral, or transdermal administration may also be used.

A KLK15 Related Protein may be conjugated to chemotherapeutic drugs, toxins, immunological response modifiers, enzymes, and radioisotopes using methods known in the art.

10 The invention also provides immunotherapeutic approaches for preventing or reducing the severity of a cancer. The clinical signs or symptoms of the cancer in a subject are indicative of a beneficial effect to the patient due to the stimulation of the subject's immune response against the cancer. Stimulating an immune response refers to inducing an immune response or enhancing the activity of immunoeffector cells in response to administration of a vaccine preparation of the invention. The prevention of a cancer can be indicated by an
15 increased time before the appearance of cancer in a patient that is predisposed to developing cancer due for example to a genetic disposition or exposure to a carcinogenic agent. The reduction in the severity of a cancer can be indicated by a decrease in size or growth rate of a tumor.

Vaccines can be derived from a KLK Related Protein, peptides derived therefrom, or chemically produced synthetic peptides, or any combination of these molecules, or fusion proteins or peptides thereof. The
20 proteins, peptides, etc. can be synthesized or prepared recombinantly or otherwise biologically, to comprise one or more amino acid sequences corresponding to one or more epitopes of a tumor associated protein. Epitopes of a tumor associated protein will be understood to include the possibility that in some instances amino acid sequence variations of a naturally occurring protein or polypeptide may be antigenic and confer protective immunity against cancer or anti-tumorigenic effects. Sequence variations may include without
25 limitation, amino acid substitutions, extensions, deletions, truncations, interpolations, and combinations thereof. Such variations fall within the scope of the invention provided the protein containing them is immunogenic and antibodies against such polypeptide cross-react with naturally occurring KLK15 Related Protein to a sufficient extent to provide protective immunity and/or anti-tumorigenic activity when administered as a vaccine.

The proteins, peptides etc. can be incorporated into vaccines capable of inducing an immune response
30 using methods known in the art. Techniques for enhancing the antigenicity of the proteins, peptides, etc. are known in the art and include incorporation into a multimeric structure, binding to a highly immunogenic protein carrier, for example, keyhole limpet hemocyanin (KLH), or diphtheria toxoid, and administration in combination with adjuvants or any other enhancer of immune response.

Vaccines may be combined with physiologically acceptable media, including immunologically
35 acceptable diluents and carriers as well as commonly employed adjuvants such as Freund's Complete Adjuvant, saponin, alum, and the like.

It will be further appreciated that anti-idiotypic antibodies to antibodies to KLK15 Related Proteins

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 25 -

described herein are also useful as vaccines and can be similarly formulated.

The administration of a vaccine in accordance with the invention, is generally applicable to the prevention or treatment of cancers including thyroid, prostate, colon, kidney, and testicular cancer.

5 The administration to a patient of a vaccine in accordance with the invention for the prevention and/or treatment of cancer can take place before or after a surgical procedure to remove the cancer, before or after a chemotherapeutic procedure for the treatment of cancer, and before or after radiation therapy for the treatment of cancer and any combination thereof. The cancer immunotherapy in accordance with the invention would be a preferred treatment for the prevention and /or treatment of cancer, since the side effects involved are substantially minimal compared with the other available treatments e.g. surgery, chemotherapy, radiation
10 therapy. The vaccines have the potential or capability to prevent cancer in subjects without cancer but who are at risk of developing cancer.

The activity of the proteins, substances, compounds, antibodies, nucleic acid molecules, agents, and compositions of the invention may be confirmed in animal experimental model systems. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or with experimental
15 animals, such as by calculating the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The therapeutic index is the dose ratio of therapeutic to toxic effects and it can be expressed as the ED₅₀/LD₅₀ ratio. Pharmaceutical compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred.

4.4 Other Applications

20 The nucleic acid molecules disclosed herein may also be used in molecular biology techniques that have not yet been developed, provided the new techniques rely on properties of nucleotide sequences that are currently known, including but not limited to such properties as the triplet genetic code and specific base pair interactions.

The invention also provides methods for studying the function of a polypeptide of the invention.
25 Cells, tissues, and non-human animals lacking in expression or partially lacking in expression of a nucleic acid molecule or gene of the invention may be developed using recombinant expression vectors of the invention having specific deletion or insertion mutations in the gene. A recombinant expression vector may be used to inactivate or alter the endogenous gene by homologous recombination, and thereby create a deficient cell, tissue, or animal.

30 Null alleles may be generated in cells, such as embryonic stem cells by deletion mutation. A recombinant gene may also be engineered to contain an insertion mutation that inactivates the gene. Such a construct may then be introduced into a cell, such as an embryonic stem cell, by a technique such as transfection, electroporation, injection etc. Cells lacking an intact gene may then be identified, for example by Southern blotting, Northern Blotting, or by assaying for expression of the encoded polypeptide using the
35 methods described herein. Such cells may then be fused to embryonic stem cells to generate transgenic non-human animals deficient in a polypeptide of the invention. Germline transmission of the mutation may be achieved, for example, by aggregating the embryonic stem cells with early stage embryos, such as 8 cell

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 26 -

embryos, *in vitro*; transferring the resulting blastocysts into recipient females and; generating germline transmission of the resulting aggregation chimeras. Such a mutant animal may be used to define specific cell populations, developmental patterns and *in vivo* processes, normally dependent on gene expression.

The invention thus provides a transgenic non-human mammal all of whose germ cells and somatic cells contain a recombinant expression vector that inactivates or alters a gene encoding a KLK15 Related Protein. In an embodiment the invention provides a transgenic non-human mammal all of whose germ cells and somatic cells contain a recombinant expression vector that inactivates or alters a gene encoding a KLK15 Related Protein resulting in a KLK15 Related Protein associated pathology. Further, the invention provides a transgenic non-human mammal which does not express or has altered (e.g. reduced) expression of a KLK15 Related Protein of the invention. In an embodiment, the invention provides a transgenic non-human mammal which does not express or has reduced expression of a KLK15 Related Protein of the invention resulting in a KLK15 Related Protein associated pathology. A KLK15 Related Protein pathology refers to a phenotype observed for a KLK15 Related Protein homozygous or heterozygous mutant.

A transgenic non-human animal includes but is not limited to mouse, rat, rabbit, sheep, hamster, dog, cat, goat, and monkey, preferably mouse.

The invention also provides a transgenic non-human animal assay system which provides a model system for testing for an agent that reduces or inhibits a pathology associated with a KLK15 Related Protein, preferably a KLK15 Related Protein associated pathology, comprising:

- (a) administering the agent to a transgenic non-human animal of the invention; and
- (b) determining whether said agent reduces or inhibits the pathology (e.g. KLK15 Related Protein associated pathology) in the transgenic non-human animal relative to a transgenic non-human animal of step (a) which has not been administered the agent.

The agent may be useful in the treatment and prophylaxis of conditions such as cancer as discussed herein. The agents may also be incorporated in a pharmaceutical composition as described herein.

The following non-limiting example is illustrative of the present invention:

Example

Materials and Methods

Identification of the new gene

A contiguous map for the human kallikrein gene locus extending from the KLK1 gene (centromere) to the KLK14 gene (telomere) (7,8,11,12,27) was constructed. Overlapping bacterial artificial chromosome (BAC) clones spanning this area were identified by screening of a human BAC library using different radiolabeled gene-specific probes. An area of ~ 300 kb of genomic sequence was established using different techniques, as previously described (11,27). By performing an EcoR1 restriction analysis, the kallikrein locus was oriented along the EcoR1 restriction map of chromosome 19q13 available from the Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL). A BAC clone that extends more centromerically (BC 781134) was then identified. Contigs of linear genomic sequences from this clone are available from the LLNL. Initially, these contig sequences were used to predict the presence of novel genes, using bioinformatic approaches, as

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 27 -

previously described (8,12), and a putative new serine protease was identified. The sequence of the putative gene was then verified by different approaches including sequencing, EST database search, PCR screening of tissues, as described below.

Expressed sequence tag (EST) searching

5 The predicted exons of the putative new gene were subjected to homology search using the BLASTN algorithm (28) on the National Center for Biotechnology Information web server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) against the human EST database (dbEST). Clones with > 95% homology were obtained from the I.M.A.G.E. consortium (29) through Research Genetics Inc, Huntsville, AL. The clones were propagated, purified as described elsewhere (30) and sequenced from both directions with an automated
10 sequencer, using insert-flanking vector primers.

Prostate cancer cell line and hormonal stimulation experiments

The LNCaP prostate cancer cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. Cells were cultured in RPMI media (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with glutamine (200 mmol/L), bovine insulin (10 mg/L), fetal bovine serum (10%), antibiotics and
15 antimycotics, in plastic flasks, to near confluency. The cells were then aliquoted into 24-well tissue culture plates and cultured to 50% confluency. 24 hours before the experiments, the culture media were changed into phenol red-free media containing 10% charcoal-stripped fetal bovine serum. For stimulation experiments, various steroid hormones dissolved in 100% ethanol were added into the culture media at a final concentration of 10^{-8} M. Cells stimulated with 100% ethanol were included as controls. The cells were cultured for 24 hours,
20 then harvested for mRNA extraction.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for the KLK15 gene

Total RNA was extracted from the LNCaP cell line or from prostate tissues using Trizol reagent (Gibco BRL) following the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined spectrophotometrically. 2 µg of total RNA was reverse-transcribed into first strand cDNA using the
25 SuperscriptTM preamplification system (Gibco BRL). The final volume was 20 µl. Based on the combined information obtained from the predicted genomic structure of the new gene and the EST sequences (see below), two gene-specific primers were designed (KLK15-F1 - SEQ ID NO. 47 and KLK15-R1 - SEQ ID NO. 48) (Table 1) and PCR was carried out in a reaction mixture containing 1 µl of cDNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (deoxynucleoside triphosphates), 150 ng of primers and 2.5 units of HotStatTM DNA polymerase (Qiagen Inc., Valencia, CA) on a Perkin-Elmer 9600 thermal cycler. The
30 cycling conditions were 95°C for 15 minutes to activate the Taq DNA polymerase, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 64°C for 30 s, 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 10 min. Equal amounts of PCR products were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. All primers for RT-PCR spanned at least 2 exons to avoid contamination by genomic DNA. To verify the identity
35 of the PCR products, they were cloned into the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The inserts were sequenced from both directions using vector-specific primers, with an automated DNA sequencer.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 28 -

Tissue expression

Total RNA isolated from 26 different human tissues was purchased from Clontech, Palo Alto, CA. cDNA was prepared as described above for the tissue culture experiments and used for PCR reactions. Tissue cDNAs were amplified at various dilutions using two gene-specific primers (KLK15-F2 - SEQ ID NO. 49 and KLK15-R1 - SEQ ID NO. 48) (Table 1). Due to the high degree of homology between kallikreins, and to exclude non-specific amplification, PCR products were cloned and sequenced.

Prostate cancer tissues

Prostate tissue samples were obtained from 29 patients who had undergone radical retropubic prostatectomy for prostatic adenocarcinoma at the Charite University Hospital, Berlin, Germany. The patients did not receive any hormonal therapy before surgery. The use of these tissues for research purposes was approved by the Ethics Committee of the Charite Hospital. Fresh prostate tissue samples were obtained from the cancerous and non-cancerous parts of the same prostates that had been removed. Small pieces of tissue were dissected immediately after removal of the prostate and stored in liquid nitrogen until analysis. Histological analysis from all the tissue pieces was performed as previously described (31), to ensure that the tissue was either malignant or benign. The tissues were pulverized with a hammer under liquid nitrogen and RNA was extracted as described above, using Trizol reagent.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SAS software (SAS Institute, Cary, NC). The analysis of differences between KLK15 expression in non-cancerous versus cancerous tissues from the same patient was performed with the non-parametric McNemar test. The binomial distribution was used to compute the significance level. Prostate tumor KLK15 mRNA levels were qualitatively classified into two categories (KLK15 - low and KLK15 - high groups) and associations between KLK15 status and other variables were analyzed using the Fisher's exact test.

Structure analysis

Multiple alignment was performed using the "Clustal X" software package and the multiple alignment program available from the Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA. Phylogenetic studies were performed using the "Phylip" software package. Distance matrix analysis was performed using the "Neighbor-Joining/UPGMA" program and parsimony analysis was done using the "Protpars" program. Hydrophobicity study was performed using the Baylor College of Medicine search launcher. Signal peptide was predicted using the "SignalP" server. Protein structure analysis was performed by "SAPS" (structural analysis of protein sequence) program.

Results**Cloning of the KLK15 gene**

A contiguous map for the human kallikrein gene locus extending from the KLK1 gene (centromere) to the KLK14 gene (telomere) was previously established (7,8,11,12,27). In order to investigate the presence of other kallikrein-like genes centromeric to KLK1, a BAC clone (BC 781134) was obtained as described in materials and methods. According to the published genomic sequence of prostate specific antigen (PSA), and

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 29 -

human renal kallikrein (KLK1) genes, gene-specific primers were designed for each of these genes (Table 1, SEQ ID NOs. 47-50) and polymerase chain reaction (PCR)-based amplification protocols were developed which allowed generation of specific PCR products with genomic DNA as a template. PCR screening of the BAC clone by these gene-specific primers indicated that this clone is positive for KLK1 but negative to PSA, thus, confirming its location to be centromeric to PSA.

A putative new serine protease was predicted from the sequence of this clone by computer programs as previously described (12). This clone was digested, blotted on a membrane and hybridized with gene-specific primers for the putative KLK15 gene (according to the predicted sequence), and positive fragments were subcloned and sequenced to verify the structure of the putative gene. This putative gene sequence was then blasted against the human EST database and two EST clones were identified (GenBank accession #AW274270 and # AW205420). These two clones were 99% identical to the last exon and the 3' untranslated region of the gene and the second EST ends with a stretch of 17 adenine (A) nucleotides that were not found in the genomic sequence, thus verifying the 3' end of the gene and the position of the poly A tail.

To identify the full mRNA structure of the gene and to determine the exon/intron boundaries, PCR reactions were performed using primers located in different computer-predicted exons, using a panel of 26 human tissue cDNAs as templates. PCR products were sequenced. Two of these primers (KLK15-F1 - SEQ ID NO. 47, and KLK15-R1 - SEQ ID NO. 48) (Table 1) were able to amplify the full coding region of the gene from different tissues. Comparing the mRNA with the genomic structure indicated the presence of a gene formed of five coding exons with 4 intervening introns. Translation of the mRNA sequence in all possible reading frames revealed the presence of only one frame that gives an uninterrupted polypeptide chain, that also contains the highly conserved structural motifs of the kallikreins, as discussed below.

Structural characterization of the KLK15 gene

As shown in Figure 1, the KLK15 gene is formed of 5 coding exons and 4 intervening introns, although, as with other kallikrein genes, the presence of further upstream untranslated exon(s) could not be ruled out (17,32,33). All of the exon /intron splice sites conform to the consensus sequence for eukaryotic splice sites (34). The gene further follows strictly the common structural features of other members of the human kallikrein multigene family, as described below. The predicted protein-coding region of the gene is formed of 771 bp, encoding a deduced 256 amino acid polypeptide with a predicted molecular weight of 28.1 kDa. The potential translation initiation codon matches the consensus Kozak sequence (35), moreover, there is a purine at position (-3) which occurs in 97% of vertebrate mRNAs (36). It should also be noted, that like most other kallikrein-like genes, KLK15 does not have the consensus G nucleotide at position (+4).

Nucleotides 7764-7769 (ATTAAA) (SEQ ID NO. 40) closely resemble a consensus polyadenylation signal (37) and are followed, after 17 nucleotides, by the poly A tail. No other potential polyadenylation signals were discernable in the 3' untranslated region, suggesting that the above sequence is the actual polyadenylation signal. Although AATAAA (SEQ ID NO. 40) is highly conserved, natural variants do occur, and the ATTAAA (SEQ ID NO. 40) sequence is reported to occur as a natural polyadenylation variant in 12% of vertebrate mRNA sequences (38). The presence of glutamic acid (E) at position 203 suggests that KLK15 will likely

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 30 -

possess a unique substrate specificity. PSA has a serine (S) residue in the corresponding position and has chymotryptic-like activity. Many other kallikreins usually have aspartate (D) in this position indicating a trypsin-like activity (Figure 2) (6).

Although the KLK15 protein sequence is unique, comparative analysis revealed that it has a considerable degree of homology with other members of the kallikrein multigene family. KLK15 shows 51% protein identity and 66% similarity with the trypsin like serine protease (TLSP) and 49%, 48% identity with the neuropsin and KLK-L3 proteins, respectively. Hydrophobicity analysis revealed that the amino-terminal region is quite hydrophobic (Figure 3), consistent with the possibility that this region may harbor a signal sequence, analogous to other serine proteases. Computer analysis of the KLK15 protein sequence predicted a cleavage site between amino acids 16 and 17 (TAA-QD). Sequence alignment (Figure 2) also revealed another potential cleavage site (Lys²⁴), at a site homologous to the activation site of other serine proteases [lysine (K) or arginine (R) is present in most cases] (39). Several evenly distributed hydrophobic regions throughout the KLK15 polypeptide are consistent with a globular protein, similar to other kallikreins and serine proteases. Thus, as is the case with other kallikreins, KLK15 is presumably translated as an inactive 256 amino acid preproenzyme precursor. Prepro-KLK15 has 21 additional residues which constitute the pre-region (the signal peptide formed of 16 residues), and the propeptide (5 residues).

The dotted region in Figure 2 indicates an 11-amino acid loop characteristic of the classical kallikreins (PSA, KLK1, and KLK2) but not found in KLK15 or other members of the kallikrein multi-gene family (10,11,13,14). However, KLK15 has a unique 8 amino acid loop (HNEPGTAG) (SEQ ID NO. 10) at positions 148-155, not found in any other kallikrein (Figure 2). Twenty nine "invariant" amino acids surrounding the active site of serine proteases have been described (40). Of these, twenty eight are conserved in KLK15. One of the unconserved amino acids (Ser⁷⁹ instead of Pro) is also found in prostase, KLK-L2 and KLK-L5 proteins, and represents a conserved evolutionary change to a protein of the same group, according to protein evolution studies (41). Twelve cysteine residues are present in the putative mature KLK15 protein; ten of them are conserved in all kallikreins, and would be expected to form disulphide bridges. The other two (C131 and C243) are not found in PSA, KLK1, KLK2 or KLK-L4, however, they are found in similar positions in all other kallikrein genes and are expected to form an additional disulphide bond.

To predict the phylogenetic relatedness of the KLK15 protein with other serine proteases, the amino acid sequences were aligned together using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) and the Neighbor-Joining distance matrix methods, and the "Protpars" parsimony method. All phylogenetic trees obtained agreed that other serine proteases (non-kallikreins) can be grouped together as a separate group, indicating that kallikreins represent a separate step in the evolution of serine proteases. KLK15 was grouped with the KLK-L3 and TLSP (Figure 4) and the classical kallikreins (hK1, hK2, and PSA) are grouped together in all trees, suggesting that the separation between classical kallikreins and the kallikrein-like genes occurred early during evolution, consistent with suggestions of previous studies (13).

Splice variants of the KLK15 gene

PCR screening for KLK15 transcripts using gene-specific primers (KLK15-F2 -SEQ ID NO. 49 and

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 31 -

KLK15-R2 - SEQ ID NO. 50) (Table 1) revealed the presence of 3 bands in most of the tissue cDNAs examined (Figure 6). These bands were gel purified, cloned and sequenced. The upper band represents the classical form of the gene, and the lower band is splice variant 3 (Figure 7). The middle band represents two other splice variants. Restriction digestion of the PCR product of the middle band with Stu I, followed by gel separation, purification, and sequencing revealed that it is composed of splice variants 1 and 2 which have approximately the same length (splice variant 1 has exon 4 (137 bp) but is missing 118 bp from exon 3, while splice variant 2 has an additional 118 bp of exon 3 but missing exon 4. All splice variants are expected to encode for truncated protein products (Figure 5).

Chromosomal localization of the KLK15 gene

Restriction analysis study of a number of overlapping BAC clones spanning the human kallikrein locus followed by comparison with the EcoRI restriction map of the area (available from the LLNL web site) enabled identification of a BAC clone (BC 25479) that is telomerically adjacent to BC 781134 (which harbors the KLK15 gene). Blasting the sequences of the two clones showed that the ends of these clones are overlapping. By identifying the position of the KLK1, KLK3 and KLK15 genes along these clones, the relative location and the direction of transcription of these three genes were precisely defined. KLK1 is the most centromeric and its direction of transcription is from telomere to centromere, followed by KLK15, which is more telomeric and transcribes in the same direction. The distance between the two genes is 1501 bp in length. The KLK3 gene is more telomeric, located at a distance of 23,335 from the KLK15, and is transcribed in the opposite direction (Figure 6). These results are consistent with previous reports where the distance between KLK3 and KLK1 was roughly estimated to be ~ 31 Kb (6,27).

Tissue expression and hormonal regulation of the KLK15 gene

As shown in Figure 7, the KLK15 gene is expressed at highest levels in the thyroid gland. Lower levels of expression are also seen in the prostate, salivary and adrenal glands, colon, testis and kidney. In order to verify the RT-PCR specificity, representative PCR products were cloned and sequenced. Figure 8 shows that the KLK15 gene is up-regulated by steroid hormones in the human LNCaP prostate cancer cell line.

KLK15 expression in prostate cancer

The expression of the KLK15 gene in normal and cancerous prostatic tissues was examined by RT-PCR. Actin was included as a control gene to ensure the quality and amount of the cDNA used. In order to examine the relative expression of the KLK15 gene in normal compared with malignant tissues, 29 pairs of prostatic tissues were examined. Each pair represented normal and cancerous tissue obtained from the same patient. The results are summarized in Table 2. Thirteen out of 29 patients had significantly higher KLK15 expression in the cancer tissue and only three had the expression of KLK15 higher in non-cancer than to cancer tissues. Analysis by the McNemar test indicated that the differences between normal and cancerous tissues are statistically significant ($P=0.021$). Because of the small number of cases, the binomial distribution was used to compute the significance level. The prostate cancer patients were further classified into two groups: (a) KLK15 expression-positive ($N=21$) and (b) KLK15 expression-negative (or very low) ($N=8$). When the association of KLK15 expression was compared with clinicopathological prognostic variables higher KLK15

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 32 -

expression was found to be more frequent in patients with late stage disease and tumours of higher grade (Table 3).

Discussion

Kallikreins are a subgroup of serine proteases. The term 'kallikrein' is usually utilized to describe an enzyme that acts upon a precursor molecule (kininogen) for release of a bioactive peptide (kinin)(3,42). However, the generic term 'tissue kallikrein' is not restricted to the functional definition of the enzyme. This term is now used to describe a group of enzymes with highly conserved gene and protein structure which also co-localize in the same chromosomal locus. Among the three classical human kallikrein genes, only KLK1 encodes for a protein with potent kininogenase activity. The enzymes encoded by KLK2 and KLK3 genes have very weak kininogenase activity. The already cloned 14 members of the human kallikrein gene family have a number of similarities (7,11) as show below:

- All genes localize to the same chromosomal region (19q13.3-q13.4)
- All genes encode for putative serine proteases with a conserved catalytic triad in the appropriate positions, i.e., histidine near the end of the second coding exon, aspartic acid in the middle of the third exon, and serine at the beginning of the fifth (last) exon.
- All genes have five coding exons (some members contain one or more 5'- untranslated exons).
- Coding exon sizes are similar or identical.
- Intron phases are fully conserved.
- All genes have significant sequence homologies at the DNA and amino acid levels (30-80%).
- Many of these genes are regulated by steroid hormones.

Figures 2 and 8 show that the newly identified KLK15 gene shares all the above similarities and is thus a new member of the human kallikrein multigene family. This gene was named KLK15.

Many kallikrein genes are related to the pathogenesis of human diseases, depending on the tissue of their primary expression. The KLK1 gene is involved in many disease processes, including inflammation (3), hypertension (44), renal nephritis and diabetic renal disease (45,46). The connections of HSCCH (KLK7) with skin diseases, including pathological keratinization and psoriasis, have already been reported (47,48). Little et al. suggested that zyme (KLK6) may be amyloidogenic and may play a role in the development of Alzheimer's disease (14). There are other reports describing connection of neuropsin (KLK8) expression with diseases of the central nervous system, including epilepsy (49,50). Being primarily expressed in the thyroid, KLK15 may play an important role in the normal physiology and pathophysiology of this gland. Among all other discovered kallikreins, many are expressed in the thyroid but none at highest levels in this tissue (7,11)

The KLK15 gene is up-regulated, at the mRNA level, in a subset of prostate cancers. The distributions of KLK15 qualitative expression status (high or low) between subgroups of patients differing by disease stage, tumor grade and Gleason score indicated that high KLK15 expression was found more frequently in Grade 3 tumors as well as in stage III and Gleason score >6 patients. These findings indicate that overexpression of KLK15 is associated with more aggressive forms of the disease and may be an indicator of poor prognosis (Table 3).

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 33 -

There is now growing evidence that many kallikreins and kallikrein-like genes are related to malignancy. PSA is the best marker for prostate cancer so far (20). Recent reports suggest that hK2 (encoded by the KLK2 gene) could be another useful diagnostic marker for prostate cancer (21,51). NES1 (KLK10) appears to be a novel tumor suppressor gene (23). The zyme (KLK6) gene was shown to be differentially expressed in primary breast and ovarian tumors (24), and the human stratum corneum chymotryptic enzyme (HSCCE, KLK7) has been shown to be expressed at abnormally high levels in ovarian cancer (25). Another recently identified kallikrein-like gene, tentatively named the tumor-associated differentially expressed gene-14 (TADG-14)/neuropsin (KLK8) was found to be overexpressed in about 60% of ovarian cancer tissues (26). Pprostate/KLK-L1/ (KLK4), another newly discovered kallikrein-like gene, is speculated to be linked to prostate cancer (13). Two newly discovered kallikreins, KLK-L4 (KLK13) and KLK-L5 (KLK12), were also found to be downregulated in breast cancer (10). Thus, extensive new literature suggests multiple connections of various kallikrein genes to many forms of human cancer.

The existence of multiple alternatively spliced mRNA forms is frequent among the kallikreins. Distinct RNA species are transcribed from the PSA gene, in addition to the major 1.6 kb transcript (19,52,53). Also, Reigman et al reported the identification of two alternatively spliced forms of the human glandular kallikrein 2 (KLK2) gene (54). A novel transcript of the tissue kallikrein gene (KLK1) was also isolated from the colon (55). Neuropsin, a recently identified kallikrein-like gene, was found to have two alternatively spliced forms, in addition to the major form (26,56). KLK-L4 was also found to have different alternatively spliced forms (10). Because the splice variants of KLK15 have an identical 5' sequence required for translation, secretion and activation, it is possible to assume that they encode for a secreted protein (53).

In conclusion, a new member of the human kallikrein gene family, KLK15, has been characterized which maps to the human kallikrein locus (chromosome 19q13.3-q13.4). This gene has three related splice forms in addition to the classical form. KLK15 is expressed in a variety of tissues but predominantly in the thyroid, it appears to be up-regulated in more aggressive forms of prostate cancer and its expression is influenced by steroid hormones. Since a few other kallikreins are already used as valuable tumor markers, KLK15 may also find similar clinical applications.

Having illustrated and described the principles of the invention in a preferred embodiment, it should be appreciated to those skilled in the art that the invention can be modified in arrangement and detail without departure from such principles. All modifications coming within the scope of the following claims are claimed.

All publications, patents and patent applications referred to herein are incorporated by reference in their entirety to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 34 -

Table 1. Primers used for genomic PCR amplification.

Gene	Primer name and sequence		GenBank accession #
KLK1	KLK1-A:	ATC CCT CCA TTC CCA TCT TT	L10038
	KLK1-B:	CAC ATA CAA TTC TCT GGT TC	
KLK2	KLK2-A:	AGT GAC ACT GTC TCA GAA TT	M18157
	KLK2-B:	CCC CAA TCT CAC GAG TGC AC	
PSA	B5-A:	GTC GGC TCT GGA GAC ATT TC	M27274
	B5-B:	AAC TGG GGA GGC TTG AGT C	
KLK15	KLK15-F1	CTC CTT CCT GCT GGC ATC CA	AF242195
	KLK15-R1	ATC ACA CGG GTG GTC ATG TG	
	KLK15-F2	CAA GTG GCT CTC TAC GAG CG	
	KLK15-R2	GAC ACC AGG CTT GGT GGT GT	

* all primers are presented in 5'→3' direction.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 35 -

Table 2. KLK15 expression in 29 pairs of cancerous and non-cancerous prostatic tissues.

KLK15 Expression	Number of patients	P value *
Higher in cancer vs. normal	13	
Lower in cancer vs. normal	3	
High expression but approx. equal in both tissues	8	
Low (or no) expression but approx. equal in both tissues	5	0.021

* P value was calculated by the McNemar test using the binomial distribution.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 36 -

Table 3. Relationship between KLK15 expression and other clinicopathological variables in 29 patients with primary prostate cancer

Variable	Patients	No. of patients (%)		P value*
		KLK15 negative	KLK15 positive	
Stage				
I/II	20	8 (40)	12 (60)	0.033
III	9	0 (0)	9 (100)	
Grade				
G1/2	23	8 (34.8)	15 (65.2)	0.15
G3	6	0 (0)	6 (100)	
Gleason score				
≤6	22	7 (31.8)	15 (62.2)	0.14
>6	6	0 (0)	6 (100)	
Unknown	1			

*Fisher's Exact Test.

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 37 -

FULL CITATIONS FOR REFERENCES REFERRED TO IN THE SPECIFICATION

1. Kraut, H., K., F. E., and Werle, E. (1930) *Physiol. Chem.* **189**, 97-106
2. Werle, E. (1934) *Biochem. Z* **269**, 415-434
3. Clements, J. (1997) in *The Kinin System* (Farmer, S., ed), pp. 71-97, Academic Press, New York
- 5 4. Evans, B. A., Drinkwater, C. C., and Richards, R. I. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8027-34
5. Ashley, P. L., and MacDonald, R. J. (1985) *Biochemistry* **24**, 4520-7
6. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., Suurmeijer, L., Cleutjens, C. B., and Trapman, J. (1992) *Genomics* **14**, 6-11
7. Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Luo, L. Y., Magklara, A., and Obiezu, C. V. (2000) *Trends*
- 10 *Endocrinol. Metab.* **11**, 54-60
8. Yousef, G. M., Obiezu, C. V., Luo, L. Y., Black, M. H., and Diamandis, E. P. (1999) *Cancer Res.* **59**, 4252-6
9. Yousef, G. M., and Diamandis, E. P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 37511-6
10. Yousef, G. M., Chang, A., and Diamandis, E. P. (2000) *J Biol Chem* **275**, 11891-8.
- 15 11. Yousef, G. M., and Diamandis, E. P. (2000) *Genomics* **65**, 184-194
12. Yousef, G. M., Luo, L. Y., and Diamandis, E.P. (1999) *Anticancer Res.* **19**, 2843-52
13. Nelson, P. S., Gan, L., Ferguson, C., Moss, P., Gelinas, R., Hood, L., and Wang, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3114-9
14. Little, S. P., Dixon, E. P., Norris, F., Buckley, W., Becker, G. W., Johnson, M., Dobbins, J. R.,
- 20 Wyrick, T., Miller, J. R., MacKellar, W., Hepburn, D., Corvalan, J., McClure, D., Liu, X., Stephenson, D., Clemens, J., and Johnstone, E. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25135-42
15. Liu, X. L., Wazer, D. E., Watanabe, K., and Band, V. (1996) *Cancer Res.* **56**, 3371-9
16. Hansson, L., Stromqvist, M., Backman, A., Wallbrandt, P., Carlstein, A., and Egelrud, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19420-6
- 25 17. Yoshida, S., Taniguchi, M., Hirata, A., and Shiosaka, S. (1998) *Gene* **213**(1-2), 9-16
18. Stephenson, S. A., Verity, K., Ashworth, L. K., and Clements, J. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23210-4
19. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A., Romijn, J. C., and Trapman, J. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 95-102
- 30 20. Diamandis, E. P. (1998) *Trends Endocrinol. Metab.* **9**, 310-316
21. Stenman, U. H. (1999) *Clin. Chem.* **45**, 753-4
22. Partin, A. W., Catalona, W. J., Finlay, J. A., Darte, C., Tindall, D. J., Young, C. Y., Klee, G. G., Chan, D. W., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L., and Woodrum, D. L. (1999) *Urology* **54**, 839-45
23. Goyal, J., Smith, K. M., Cowan, J. M., Wazer, D. E., Lee, S. W., and Band, V. (1998) *Cancer Res.* **58**, 4782-6
- 35 24. Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Stenman, G., Mok, S. C., and Sager, R. (1996) *Mol. Med.* **2**, 624-36
25. Tanimoto, H., Underwood, L. J., Shigemasa, K., Yan Yan, M. S., Clarke, J., Farnley, T. H., and

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 38 -

- O'Brien, T. J. (1999) *Cancer* **86**, 2074-82
26. Underwood, L. J., Tanimoto, H., Wang, Y., Shigemasa, K., Parmley, T. H., and O'Brien, T. J. (1999) *Cancer Res.* **59**(17), 4435-9
27. Yousef, G. M., Chang, A., and Diamandis, E. P. (2000) *submitted*
- 5 28. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**(17), 3389-402
29. Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., and Soares, M. B. (1996) *Genomics* **33**, 151-2
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, NY
- 10 31. Meyer, A., Jung, K., Lein, M., Rudolph, B., Schnorr, D., and Loening, S. A. (1997) *Int. J. Cancer* **74**, 630-6
32. Luo, L., Herbrick, J. A., Scherer, S. W., Beatty, B., Squire, J., and Diamandis, E. P. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**(3), 580-6
33. Yousef, G. M., Luo, L. Y., Scherer, S. W., Sotiropoulou, G., and Diamandis, E. P. (1999) *Genomics* **62**(2), 251-9
- 15 34. Iida, Y. (1990) *J. Theor. Biol.* **145**(4), 523-33
35. Kozak, M. (1991) *J. Cell Biol.* **115**(4), 887-903
36. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**(20), 8125-48
37. Proudfoot, N. J., and Brownlee, G. G. (1976) *Nature* **263**, 211-4
- 20 38. Sheets, M. D., Ogg, S. C., and Wickens, M. P. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**(19), 5799-805
39. Keil, B. (1971) in *The enzymes* (P.D. Boyer, E., ed) Vol. 3, 3rd Ed., pp. 249-275, Academic Press, New York
40. Dayhoff, M. O. (1978) *Natl. Biomed. Res. Found.* **5**, 79-81
41. Miyata, T., Miyazawa, S., and Yasunaga, T. (1979) *J. Mol. Evol.* **12**(3), 219-36
- 25 42. Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., and Worthy, K. (1992) *Pharmacol. Rev.* **44**(1), 1-80
43. Diamandis, E. P., Yousef, G., Clements, J. et al., (2000) *Clin. Chem.* **In press**
44. Margolin, H. S., Horwitz, D., Pisano, J. J., and Keiser, H. R. (1974) *Circ. Res.* **35**(6), 820-5
45. Jaffa, A. A., Chai, K. X., Chao, J., Chao, L., and Mayfield, R. K. (1992) *Kidney Int.* **41**(4), 789-95
46. Cumming, A. D., Walsh, T., Wojtacha, D., Fleming, S., Thomson, D., and Jenkins, D. A. (1994) *Clin. Sci.* **87**(1), 5-11
- 30 47. Sondell, B., Dyberg, P., Anneroth, G. K., Ostman, P. O., and Egelrud, T. (1996) *Acta. Derm. Venereol.* **76**(3), 177-81
48. Ekholm, B., and Egelrud, T. (1999) *Arch. Dermatol. Res.* **291**(4), 195-200
49. Momota, Y., Yoshida, S., Ito, J., Shibata, M., Kato, K., Sakurai, K., Matsumoto, K., and Shiosaka, S. (1998) *Eur. J. Neurosci.* **10**(2), 760-4
- 35 50. Kishi, T., Kato, M., Shimizu, T., Kato, K., Matsumoto, K., Yoshida, S., Shiosaka, S., and Hakoshima, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4220-4

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 39 -

51. Black, M. H., Magklara, A., Obiezu, C. V., Melegos, D. N., and Diamandis, E. P. (1999) *Clin. Chem.* **45**(6 Pt 1), 790-9
52. Riegman, P. H., Klaassen, P., van der Korput, J. A., Romijn, J. C., and Trapman, J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**(1), 181-8
- 5 53. Heuze, N., Olayat, S., Gutman, N., Zani, M. L., and Courty, Y. (1999) *Cancer Res.* **59**, 2820-4
54. Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, H. A., Romijn, J. C., and Trapman, J. (1991) *Mol. Cell Endocrinol.* **76**(1-3), 181-90
55. Chen, L. M., Murray, S. R., Chai, K. X., Chao, L., and Chao, J. (1994) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**(8), 1829-38
- 10 56. Mitsui, S., Tsuruoka, N., Yamashiro, K., Nakazato, H., and Yamaguchi, N. (1999) *Eur. J. Biochem.* **260**(3), 627-34

15

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 40 -

We Claim:

1. An isolated KLK15 nucleic acid molecule of at least 30 nucleotides which hybridizes to one or more of SEQ. ID. NO. 1 through 5 or 10 through 24, or the complement of one or more of SEQ ID NO. 1 through 5 or 10 through 24 under stringent hybridization conditions.
 2. An isolated nucleic acid molecule which comprises:
 - (i) a nucleic acid sequence encoding a protein having substantial sequence identity with an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9;
 - (ii) a nucleic acid sequence encoding a protein comprising an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9;
 - (iii) nucleic acid sequences complementary to (i) or (ii);
 - (iv) a degenerate form of a nucleic acid sequence of (i) or (ii);
 - (v) a nucleic acid sequence capable of hybridizing under stringent conditions to a nucleic acid sequence in (i), (ii) or (iii);
 - (vi) a nucleic acid sequence encoding a truncation, an analog, an allelic or species variation of a protein comprising an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9; or
 - (vii) a fragment, or allelic or species variation of (i), (ii) or (iii).
 3. An isolated nucleic acid molecule which comprises:
 - (i) a nucleic acid sequence comprising the sequence of one or more of SEQ.ID.NO. 1 through 5 or 10 through 24, wherein T can also be U;
 - (ii) nucleic acid sequences complementary to (i), preferably complementary to the full nucleic acid sequence of one or more of SEQ.ID.NO. 1 through 5 or 10 through 24;
 - (iii) a nucleic acid capable of hybridizing under stringent conditions to a nucleic acid of (i) or (ii) and preferably having at least 18 nucleotides; or
 - (iv) a nucleic acid molecule differing from any of the nucleic acids of (i) to (iii) in codon sequences due to the degeneracy of the genetic code.
 4. A vector comprising a nucleic acid molecule of any of the preceding claims.
 5. A host cell comprising a nucleic acid molecule of any of the preceding claims.
 6. An isolated protein comprising an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9.
 7. A method for preparing a protein as claimed in claim 6 comprising:
 - (a) transferring a vector as claimed in claim 4 into a host cell;
 - (b) selecting transformed host cells from untransformed host cells;
 - (c) culturing a selected transformed host cell under conditions which allow expression of the protein; and
 - (d) isolating the protein.
 8. A protein prepared in accordance with the method of claim 7.
 9. An antibody having specificity against an epitope of a protein as claimed in claim 6.
-

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 41 -

10. An antibody as claimed in claim 9 labeled with a detectable substance and used to detect the polypeptide in biological samples, tissues, and cells.
 11. A probe comprising a sequence encoding a protein as claimed in claim 6, or a part thereof.
 12. A method of diagnosing and monitoring a condition associated with a protein as claimed in claim 6 by
5 determining the presence of a nucleic acid molecule as claimed in any of the preceding claims or a protein as claimed in any of the preceding claims.
 13. A method as claimed in claim 12 wherein the condition is cancer.
 14. A method for identifying a substance which associates with a protein as claimed in claim 6 comprising
10 (a) reacting the protein with at least one substance which potentially can associate with the protein, under conditions which permit the association between the substance and protein, and
(b) removing or detecting protein associated with the substance, wherein detection of associated protein and substance indicates the substance associates with the protein.
 15. A method for evaluating a compound for its ability to modulate the biological activity of a protein as claimed in claim 6 comprising providing the protein with a substance which associates with the protein
15 and a test compound under conditions which permit the formation of complexes between the substance and protein, and removing and/or detecting complexes.
 16. A method for identifying inhibitors of a KLK15 Related Protein interaction, comprising
(a) providing a reaction mixture including the KLK15 Related Protein and a substance that binds
20 to the KLK15 Related Protein, or at least a portion of each which interact;
(b) contacting the reaction mixture with one or more test compounds;
(c) identifying compounds which inhibit the interaction of the KLK15 Related Protein and substance.
 17. A method for detecting a nucleic acid molecule encoding a protein comprising an amino acid sequence of SEQ. ID. NO. 6, 7, 8, or 9 in a biological sample comprising the steps of:
25 (a) hybridizing a nucleic acid molecule of claim 1 to nucleic acids of the biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
(b) detecting the hybridization complex wherein the presence of the hybridization complex correlates with the presence of a nucleic acid molecule encoding the protein in the biological sample.
 - 30 18. A method as claimed in claim 17 wherein nucleic acids of the biological sample are amplified by the polymerase chain reaction prior to the hybridizing step.
 19. A method for monitoring the progression of cancer in an individual, comprising:
(a) contacting an amount of an antibody which binds to a KLK15 Related Protein, with a sample from
35 the individual so as to form a binary complex comprising the antibody and KLK15 Related Protein in the sample;
(b) determining or detecting the presence or amount of complex formation in the sample;
(c) repeating steps (a) and (b) at a point later in time; and
-

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

- 42 -

- (d) comparing the result of step (b) with the result of step (c), wherein a difference in the amount of complex formation is indicative of the progression of cancer in said individual.
20. A method for treating a condition mediated by a protein as claimed in claim 6 comprising administering an effective amount of a compound identified in accordance with a method claimed in claim 15 or 16.
- 5 21. A method as claimed in claim 20 wherein the condition is cancer.
22. A composition comprising one or more of a nucleic acid molecule or protein claimed in any of the preceding claims, or a substance or compound identified using a method as claimed in any of the preceding claims, and a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or diluent.
- 10 23. Use of one or more of a nucleic acid molecule or protein claimed in any of the preceding claims, or a substance or compound identified using a method as claimed in any of the preceding claims in the preparation of a pharmaceutical composition for treating a condition mediated by a protein as claimed in claim 6, or a nucleic acid molecule as claimed in claim 1.
24. A method of conducting a drug discovery business comprising:
- 15 (a) providing one or more assay systems for identifying agents by their ability to inhibit or potentiate the interaction of a KLK15 Related Protein and a substance that binds to the KLK15 Related Protein;
- (b) conducting therapeutic profiling of agents identified in step (a), or further analogs thereof, for efficacy and toxicity in animals; and
- 20 (c) formulating a pharmaceutical preparation including one or more agents identified in step (b) as having an acceptable therapeutic profile.
25. A vaccine for stimulating or enhancing in a subject to whom the vaccine is administered production of antibodies directed against a protein as claimed in claim 6.
26. A method for stimulating or enhancing in a subject production of antibodies directed against a protein as claimed in claim 6.
- 25 27. A method as claimed in claim 26 comprising administering to the subject a vaccine as claimed in claim 25 in a dose effective for stimulating or enhancing production of the antibodies.
28. A method for treating, preventing, or delaying recurrence of cancer comprising administering to the subject a vaccine as claimed in claim 25 in a dose effective for treating, preventing, or delaying recurrence of cancer.
- 30
-

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

1/11
Figure 1

TGGATTCTCTCACTCCCTCCCCAGACTGCAGCCGAACCCCTGGTCCCTCTCCACA
(ATG) TGG CTT CTC CTC ACT CTC TCC TTC CTG CTG GCA TCC ACA
M W L L L L T L S F L L A S T
G gtgaggtggccccaggagggggccaggtctgtgtggagcaggtg.....
...Intron1.....gcatacctctacccttctcttag CA GCC CAG
A A Q
GAT GGT GAC AAG TTG CTG GAA GGT GAC GAG TGT GCA CCC CAC
D G D K L L E G D E C A P H
TCC CAG CCA TGG CAA GTG GCT CTC TAC GAG CGT GGA CGC TTT
S Q P W Q V A L Y E R G R F
AAC TGT GGC GCT TCC CTC ATC TCC CCA CAC TGG GTG CTG TCT
N C G A S L I S P H W V L S
GCG GCC CAC TGC CAA AGC CG gtatgaaggcaggggtcagggtcctga
A A [H] C Q S R
ggga.....Intron 2cgcaactccactggcgggaaa
accactgcggcgacacag C TTC ATG AGA GTG CGC CTG GGA GAG CAC
F M R V R L G E H
AAC CTG CGC AAG CGC GAT GGC CCA GAG CAA CTA CGG ACC ACG
N L R K R D G P E Q L R T T
TCT CGG GTC ATT CCA CAC CCG CGC TAC GAA CGC CGC AGC CAC
S R V I P H P R Y E A R S H
CGC AAC GAC ATC ATG TTG CTG CGC CTA GTC CAG CCC GCA CGC
R N [D] I M L L R L V Q P A R
CTG AAC CCC CAG GTG CGC CCC GCG GTG CTA CCC ACG CGT TGC
L N P Q V R P A V L P T R C
CCC CAC CCG GGG GAG GCC TGT GTG GTG TCT GGC TGG GGC CTG
P H P G E A C V V S G W G L
GTG TCC CAC AAC GAG CCT GGG ACC GCT GGG AGC CCC CGG TCA
V S H N E P G T A G S P R S
CAA G gtgogtgaaggtatggagctggat.....Intron 3.....
Q
ctccaagtccactgtcttccccag TG AGT CTC CCA GAT ACG TTG CAT
V S L P D T L H
TGT GCC AAC ATC AGC ATT ATC TCG GAC ACA TCT TGT GAC AAG
C A N I S I I S D T S C D K
AGC TAC CCA GGG CGC CTG ACA AAC ACC ATG GTG TGT GCA GGC
S Y P G R L T N T M V C A G
GCG GAG GGC AGA GGC GCA GAA TCC TGT GAG gtcagagccttagagg
A E G R G A E S C E
ggccatcaggcggaagaagaggg.....Intron 4.....cct
gagacccctcttcttccccacag GGT GAC TCT GGG GGA CCC CTG GTC
G D [S] G G P L V
TGT GGG GGC ATC CTG CAG GGC ATT GTG TCC TGG GGT GAC GTC
C G G I L Q G I V S W G D V
CCT TGT GAC AAC ACC ACC AAG CCT GGT GTC TAT ACC AAA GTC
P C D N T T K P G V Y T K V
TGC CAC TAC TTG GAG TGG ATC AGG GAA ACC ATG AAG AGG AAC
C H Y L E W I R E T M K R N
(TGA)CTATCTCTAGCCTATCTCTGTGCCCCGACTGAGCAGAAGCCCCACAGCTGGCCAGCAGCCC

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

22 OCT 2001 2.10.01

2/11

Figure 1 Cont'd

CGCCTGACATGGAAACAGAACGGAGCCATCCCCAAGACCCCTGTCCAAGGCCAGATGTTAGCCAAGG
ACTTGTCCACCCTGAGGACAAAGCTGGGCTCAAGTCACTGTTTAAATGCCAAGTACAAAGCGC
TGATCCAAAGTTGCTCTGTAGGAATTCTGTGACTTTTCTGGGGTCAAAGGAAACCCGAGACAC
TGATACACTGTTCCTTTTCAACCCACCAACCCGATCCCTAGGTGAGGAGAAAGCGGCTTGAGCAGGGCT
CCATTCAATTCAACACACATGACCACCGTGTGATCTTGAAACAAGAGGCCAAATCTACATTGCGCTTG
GTTTCCTTATCTGTAAAATGAGACCATCTTATTGCTGACTTCAAAGGGCTGTTGTGAGGATTAAATG
AGATGATTCGTCTGAACTGATTAATAATCGTGTCTGGCACTGA

3/11
Figure 2

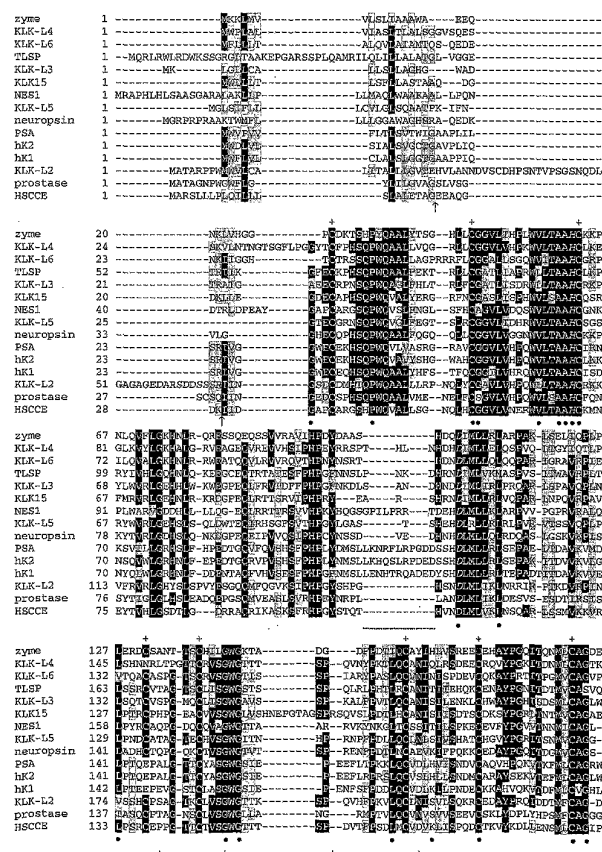


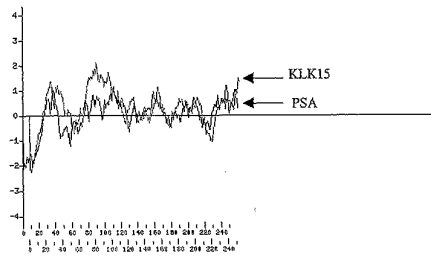
Figure 2 Cont'd

[illegible]

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

5/11
Figure 3

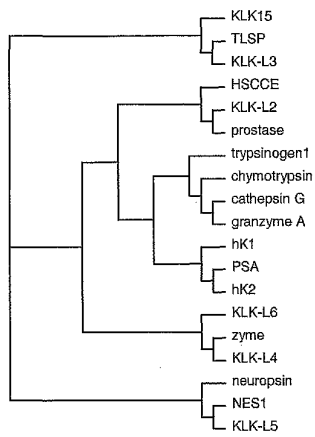


WO 02/14485

PCT/CA01/01141

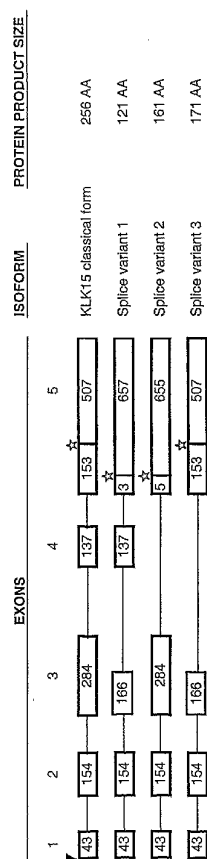
6/11

Figure 4



7/11

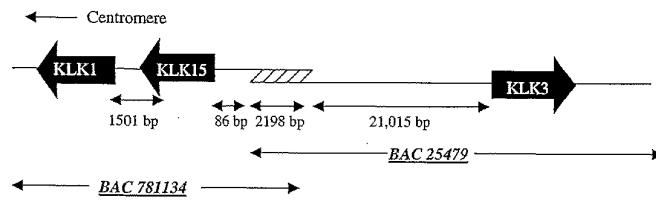
Figure 5



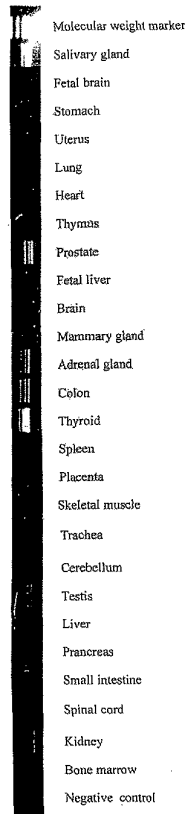
WO 02/14485

PCT/CA01/01141

8/11
Figure 6



WO 02/14485

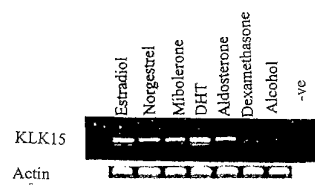
PCT/CA01/01141
2001.10.109/11
Figure 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

10/11
Figure 8

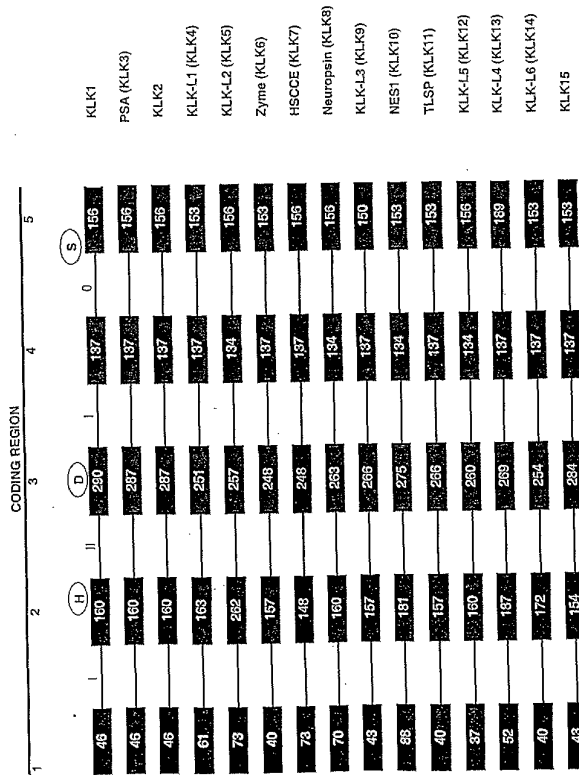


WO 02/14485

PCT/CA01/01141

11/11

Figure 9



WO 02/14485

PCT/CA01/01141

1/12

SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO 1

KLK15 full genomic structure

```

1  agaatggggtg  ctgtgggatt  caggggagac  acctgttagg  tgttggggcc  tccagaaga
61  ggtgggggca  gactgtcaga  ggcacaagat  gaatttgaa  gatattggga  agaaggattt
121 caattccacc  tcaagcttc  ctgagggctc  ccgtgggtcg  ggccctgcag  tactggagac
181  ccagagtggg  gtccagccag  ctctcggggg  agctgccagt  ctctgtaggg  aggcagacac
241  cactgagggg  caggggaggt  cagagaaggg  ctcaaggagg  aagcggggct  ggaagggaat
301  ggctgtggat  atgctgtggg  aggaatagcc  taagcatgaa  atggcaggag  ggaatatggc
361  agcactggct  gcgtctagga  caaggtcatg  ggagaccag  ggagggggcc  tggaaaggaa
421  gaagccactt  ttgtccctga  aagtgaaggt  ggagccaggg  aactcatgcc  tgaatccca
481  gaacttggg  agctgtgagc  ggtgtgatca  ctgaggtcca  ggaagtcaaa  accagctggg
541  ccaactgggt  gaactcgt  ctctactaaa  attcaaaaa  ttgctggg  gtgtgtggcc
601  acacctgtaa  tcccaattgc  ttgggaggct  gaggccagg  aatctcttga  accccaagg
661  cagagggttac  agtgagcgga  gatcacgcca  ctccactcca  acctgggcta  cagagccaga
721  ctccgtctca  aaaaaaaaa  aaaaaaagaa  aaaaaagaa  agaaagtcaa  ttgaagagc
781  tggactttat  cctgtgggtg  ccaaggatcc  atggaggttg  gtgagcagg  gaggggcaca
841  gccagctcca  gatgtagnaa  gaacctttgg  ggtcatggct  ggaggccag  ctggtggagg
901  gaactggact  ggagggggac  ccaaaagccc  agtaagagg  gttagatag  accagctggg
961  gtggctcatg  cctgtaatcc  cagaactttg  ggagccagag  gtgggtgat  catgaagcca
1021 agagattgag  gccatcctgg  ctaaacagg  gaaacctgt  ctctacttaa  aaaaaaaaa
1081  ttccaaaaaa  attagccggg  ccaggtgggt  ggcgctgt  gtccagcta  ctggggaggc
1141  tgaggcgagg  gaattgtgt  aacctgggag  gtggagcttg  cagtgcagg  acattgtgcc
1201  actgcactcc  agctgggtg  acagagtgg  actcgtctc  aaaaaataa  aaaaagtgg
1261  gacagggggg  ccttgctgta  tgaatgagag  agatccccc  cctgttagca  tgggtcctga
1321  ggtcagcagg  tggaggggt  ctgtccaggt  ctgtcagga  agagtcaaa  cctgtgctg
1381  ttccagagat  gggggaccca  gaaaggagcg  cagagtggg  ttgggggag  ggaatccgg
1441  tggtcagag  aaatttatta  acagtggatg  ggaatagct  gtgtctggag  ggaatcctgt
1501  ggagcagaaa  ggttcctgcc  tcaactggat  tctctcact  cctccacaga  ctgcagcaga
1561  accctggctc  ctctccaca  atgtggcttc  tctcactct  ctctctcctg  ctggcatcca
1621  caggtgggtg  gggccacaga  gggggccagg  tctgtgggag  caggtgcccc  ctcccaagc
1681  atgtctgggc  ccagtgatct  gccagccct  acctcacc  gagaccata  agatctctc
1741  ctcaacctc  cactgtggt  aatgtcccta  agcccttacc  gtccaggtg  ggtgtgctg
1801  ctctggagtc  gctatgttgc  ctggggcttc  tctgtccca  cgaacaggaa  cagctctctg
1861  ggtgtacaca  aacctgagct  gactcctggg  gcaacccgt  ccttctgtgt  tgtccttgag
1921  ggaactgctt  caactctctg  ggtctcgaat  gccctctcta  taagacagca  ccaacttgag
1981  acaataacag  tgaggtctca  atagcataac  agaggtata  tacatagcaa  gcaatagaca
2041  agtgcctaga  ggcacacgc  acagacagac  tccagcttga  gtcccaaccc  tgcactccc
2101  tctctcttac  aggtctcttg  agggatcaa  atgtgtgtgt  gtgtgagcca  gagacataag
2161  cctggccagc  gtatgtgccc  ttccagtggt  caagcaggg  acgtgtctta  gacttcaat
2221  acaacgtcta  tgtgtgtgtg  gccacacaga  cctcaattga  caagggaagg  ggtgtgtgt
2281  cagagggagc  gccacaacat  caaggtcacc  ttgggtgtca  ggcacaacct  agattgaat
2341  cagctggccc  acaccaagaa  attaatgtta  acctgatgcc  tctctcttgg  agaaattggg
2401  ggggtgactt  tcattaaagt  tctgcacaa  atgacctcca  ctctggggg  cccctgagac
2461  ccccaagcct  ccagctccc  ctccgctct  ctctgtgac  taacctacct  gctcggccc
2521  tgcctgtctc  gccagctgg  gccctccac  tctctctgg  ttgagctggc  caggtgcagc
2581  ctgggtggcc  agctgttag  ccctccact  ccgctccct  gagagcagcc  tccactctc
2641  ttgtttaagc  ccttgttcca  ccaatccgc  attccctgg  tctcagggg  gctttggcc
2701  cagttcctga  ctgtgatgg  gagaagtgg  gccattgttc  ttgctgtgca  aatcctggcc
2761  ctgtgtgggt  gggagtggt  atgcttcaa  ccttcagggg  atgcctccc  attgccagc
2821  ggagaggggt  cctggtctgt  tgaccttgaa  tgtctctaat  catgtcctta  agcataatgc
2881  cattctgtgt  gtgtgtgtgt  gtgtgtgtgt  gtacatgcac  gtgtgcagt  ggtatacaag
2941  gccctgtatg  ttcaatctct  ctccactgc  atgagccaga  tcccataatg  tgaaccacaa
3001  tcaatgactc  cagacatctg  gcttggggg  tgaattagag  atggataaat  atgtctggc
3061  ctggctgctc  ctggcttcag  ctgcatgtct  ttgaccttga  atgcccagcc  cgtgtctgtg
3121  gtgtgtcccc  agacagcaag  tccacatctg  agtgtgtggc  ttctgggttg  gtgtctgcag
3181  ctctaactct  acaaaatgtc  ttgtgggtga  atcaggttt  taaccttgac  tttttttgt
3241  ttgtttgtgt  ttttttgaga  cggagtctcg  ctctgccccc  caagctggag  ttcatgtgtg
3301  caaactcagc  tcactgcac  ctccgctcc  caggttcaag  caattctgtc  tctgctccc
3361  gagtagctag  aattcaggg  agcacaccc  acgcccagct  gatttttga  tttttatata
3421  tttatttatt  ttttttttag  tagagcggg  attcaagat  gttggccagg  ctggtctcaa
3481  actcctgacc  tcaggtgate  caccaccte  gcccttggcc  tcccaaatg  ctgggtattc
3541  aggcgtgagc  caccacaact  ggcacaact  gactatttat  tataggtaat  tctgtgcaga
3601  tgtctgactt  atgttgcca  tctccaggat  ggaactgaac  ttccacagt  atgtcctgtg

```

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

2/12

```

3661 gactaaatcc aggtgtcatt tgcataaac aactaatatt attagtagc taacagggtc
3721 aggtatcact caccatacat acacacatgc acacacacac atacacatc ctacctatc
3781 cttaacacaa tcttcatttt acagatgagg aaacagaggc acagacaggt cgaataactt
3841 actcaaatgt tcacagctag tacattcgaa ccagagctta aggacccatc ttgtccaga
3901 cctgtatgco aagtgtctgt gacactggat gccagactc acactagaga tgtgaattt
3961 aggtctgaac aatatccaat tctgtgtgtg tgttbtgttg tgcattgtgt tgtgttatg
4021 tattcatgct ttaacacatc atattcaat acacatatga acatctgtgc tgcattctt
4081 tttttttttt tttttttttt ttbgagatgg agtttcaact ttgtccacca ggtgtgagtg
4141 caatggagca aactcogctc actgcaatct ccgctccogc ggttcaagcg attttctgc
4201 ctacgctctc agagttagct ggattacagg caccgcccac catgcccagc taattttttg
4261 tattttttgt agagacaggg ttccccata ttggccaggc ttgtctcgaa ctctgacct
4321 caggtgaccc acccgctctg gctcccaaaa gtgctgggat tacaggcatg agccacgtg
4381 cccgctctgt gctgtgattc ttgaagctgc aaccatgtg catcaagtg aattcaagct
4441 tccagctctg tccatagctg taccatagtg tggagctgg abgtgcatg atgctgtct
4501 atgacctgtg atagctcgtc ctggactcca tctgcaaac ttgaatttggc tgcattgtc
4561 agactctggg gccaaagctg ggtcacacat actgagtgcc cccatgctt tgcattctg
4621 gacattttgg tgacgtgtaa tgactgttt caagtaccaa cctgtctgaa cctgtatcca
4681 gtgcctctgt ctccaccccc aaccacagag gaactcttgc cctctgtct gtctccctc
4741 ctctctctcc cagagtctta tagcaaatgg ggtgggggct agagtcttgg agaaaacagg
4801 cagcggttgt aaataaacaa caggccagcg ggagcttgt ggtccacacc ggtatccca
4861 gcactctggg aggtctgagc gggcagagca ttgtagatga gaagtctgag actcactggc
4921 taactctgtg agactcgtc tctccataaa atccaaaatc tagccagtg tgcattgtc
4981 cactctagct actcggaggg ctgagcgagg aggalcactt gaaccacgga ggcggaagt
5041 gcactgagct gagctcatgc cactgcactc cagctctggc aaagagtgta gactcctct
5101 caaaaacac aacacacaca aaacaaaaa caggccaggg ttgtctgaga agttagggga
5161 aaggtcatagg catatagtag ttaggccagg gtgcaaggaa ggtgtaggag gcaatctaa
5221 cgtccctgtc ctacggctat cctaccctc tctcttagca gccacagatg gtgcaagtt
5281 gctggaaggt gacgagtggt ccccccctc ccagccatgg caagtgtctc tgcattgtc
5341 tgagctgttt acgtctgtg ctccctcact ctcccaactc tgggtctgtg tgcattgtc
5401 ctgcacaaag cgttatgaag gcaggggctc aggtctctga gggagctctg ttcggggga
5461 agagctctta gatttggggg agacggaggc cagcgcagc aactcctggg ttctgaaga
5521 cgaaggagcc ggaatgtcaag ccctgggtt aggaaggagt gtgtgttca aagctctga
5581 tctctgaagg aggaaggaga agactagt cagcttttga gctcagttc tagggatgt
5641 agaactctgg attcggggac agaccaggag ggggctggga gtgttggag gggatcaggt
5701 tctaggagtg tgcctgactc cagctcgtt ggtcttagag gacagggggc tggaaactt
5761 ggtctcagtg tctgggaaa agtlaatggt atgtcgagat ttctaaaggc tggggagcc
5821 tccgggtgcc cactcttga tcttctgtc ctctacttgc gggtaacac tggcccgac
5881 tccactggcg ggaataccac tgcgccgac agttctatga gagtgcgctc ggggagcac
5941 aactctcgca agcgcgatgg ccagagcaca ctacggacca cgtctcggtt cattccac
6001 ccgctgacg aagcgcgacg ccacgcgcaa gacatcatgt tgcctgcctt agtccagccc
6061 gcaagcttga acccccaggt ggcgccgctg gtgtaccca cgggttgcgc ccaccgggg
6121 gaggctctgt tgggtcttga ctggggctgt gtgtccaca acagagctggg gaacgtggg
6181 agcccccgtt ccaaggtgct gtaaaaagat ggagctgagt gggagggctc aagggaact
6241 atgtctcagc gctcttgggc ggaggggaca agggccggaa ttatggatc tgcctcaag
6301 cactgtcttt cccagtgag tctccagat acgttgcat gtgcaacat cagcattatc
6361 tgggacacat ctgttgaca gagctacca gggcgctga caaacacat ggtgtgtga
6421 ggcgcggagg gcagagggcg agaactctgt ggggtcagag cctagagggg ccatcagcg
6481 gaagaagagg gatggggaca ggtgtggag tccggatggg gttggatttt cttgtcttg
6541 ggcagagaga gatgtcagg ttaggcttga agatggagta ggaagagag ttgattagg
6601 ggtgaggttg gagtctgggt tatagggtgg gattgggtg ttgaggttg atagattga
6661 tagttagttt gagatggcat ggttgggtt tgagaatgg aatggtttg tttgattctg
6721 ggtgggaat acgtcaggtt gaattggga tgaggttag tttgtttga atgcagaaga
6781 catgaagatt gagattggtt tttagatgg gcatgggtt gatttgatt tgaatgtga
6841 ggtgtgggc tgagttggtt ttaacttagt acagtgcac ttgagttga tgggggtgag
6901 attggtatata ggttgggtga gttgtatga gctgtttga atgggggtg ggggtgggt
6961 tgggtgggt ctgttggga taaactggc tglattgagt tgaattgggt tgggtttcc
7021 tgggtgggt atggattgg tttaggttga gattgcaat ggtgattag atagattga
7081 atccagagg tttaactcaa cctgagacc cctctttcc ccacaggtg actctgggg
7141 acccttggtc tgtgggggca tctgcaggg cattgtgtcc tgggggtgac tccctgtga
7201 caaacacac aagcctggtg tctataccaa agtctgcac tacttggagt ggaatcagga
7261 aacctgaag aggaactgac tatctagcc tatctcgtg gccctgact ggcagaagc
7321 cccacagct ggcagagcgc cccgctgac atggaaacga acgagccat ccccaagac
7381 cctgtccaag gccagagatg tagcaagga ctgttccac ctgagacaa agctggcgt
7441 caaggtcacc tgtttaatgc caagatacaa aagcgtgat ccaagttgt cgtgaggaat
7501 ttctgtgact tttttctggg gtcaagaga aacccgaga cactgtacac tgttctctt
7561 caccacacac ccgatccct aggtgaggag aagcgcttg aagcagggct ccaattctt
7621 aacacacatg accacccgtg tgattctgaa caagaggccc aactcactt cgccttggtt

```

PCT/CA01/01141

7681	ttcttctatcgt	ttctatgaga	ctcatctatt	gtgtcactta	aaggctggta	gtgaggaata
7711	atcttgatgata	ttctgtatga	ctgtataaaa	ttgtttctgt	ctcagcttta	ataccctta
7801	ttcttctgagc	ccagttagaag	ctgacttggc	acacatagat	ttcattgatt	gttttttttt
7861	taagttgttc	ttcttggcgc	ggcattcgtg	ctacacactg	aaacacagc	actttgggag
7921	gcaacaggcg	ggcgctcatc	tgagcttaag	atgtcaaacg	cagcgtctgc	aaactgtgta
7981	accocactat	ctctataaaa	ctatcaaaaa	attatgcggc	gtcgttgpgc	accagctgtg
8011	gagctggcgc	gagatcgtgc	ctatcgtcac	cagcgtctgt	cagacagacc	ctactcatc
8101	agaaaaaaaa	aaaaaaaata	aaagatttat	ttctggctgt	ctcgttgacc	atgtgcaaaa
8221	ggcgaataat	gtctcttttc	ttacagcaat	ctcgtatata	agcagagctt	ggaaactctg
8281	gtctgtctga	ttttccaaaa	agcgaacagc	aacctgtgtt	agcgtcatac	gtttaccatt
8341	gaggtctgag	tgactatagt	ctcatatata	ttcagaagcc	aaaaaatgtt	atgtcttgta
8401	tcgtctgtga	tgacatctgt	tgacatctgc	tcgttgagac	taaaatgctt	actctgtggt
8461	tcgtctgtga	tgacatctgt	tgacatctgc	tcgttgagac	taaaatgctt	actctgtggt
8521	ccagatctgt	ggactttctg	ggacccgagt	tgacacacat	aatgtgaaaa	gaagtctgtg
8581	gtcttttggc	ccocctgtgt	tgggccgtgt	ccgagtttgt	atgtgaaaa	ttactctggg
8641	acccttgaca	ctatcgttgt	ggggccacaa	ttgtgtgttc	ccacacatct	tttagtgaca
8701	attcttgcca	accctgtgtg	agtgaacgcg	cttgcg		

Classic mRNA (1581..1623, 5259..5412, 5913..6196, 6317..6453)

SEQ ID NO 3

[illegible]

SEQ ID NO 4

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

4/12

KLK 15 mRNA SPLICE 2 structure (1581..1623, 5259..5412, 5913..6196,
7127..7786)

ATGTGGCTTCTCCTCACTCTCTCCTTCTGCTGGCACTCCACAGCAGCCAGGATGGTACAAAGTTGCTGGAGGGTG
ACGAGTGTGCACCCCACTCCAGCCATGGCAAGTGGCTCTCTACGAGCGTGGACGCTTAACTGTGGCGCTTCCCT
CATCTCCCACTACCTGGGTGCTGCTGCGGCCCACTGCGCAAGCGCTTCTATGAGAGTGGCGCTGGGAGACACAAC
CTGGCCAAAGCGGATGGCCAGAGCACTACGAGCCAGCTCTCGGTCATTCCACACCCCGCTAGAGAGCGGCA
GCCACCGCAACGACATCATGTGCTGCGCTTAGTCCAGCCCGCAGCGCTGAACCCCAAGGTGCGCCCGCGGTGCT
AACCACGCGTGTGCCCAACCCGGGGGAGGCTCTGTGGTGTCTGAGTGGGGCTGGTGTCCACACAGAGCTGGG
ACCGCTGGGAGCGCCCGGTACAAAGGTGACTCTGGGGGACCCCTGGTCTGTGGGGGCATCTGCAAGGCAATTGGT
TCTGGGGGTGAGCTCCCTTGTGACACACCAACCAAGCTGGTGTCTATACCAAGTCTGCCACTACTTGGAGTGGGA
TCAGGGAACCATGAAGAGGAACTGACTATTCTAGCCTATCTCTGTGCCCTTGACTGAGCAGAAAGCCCCACAGC
TGGCCAGCAGCGCCCGCTGACATGGAACAGAACGGAGCCTACCCCAAGGCCCTGTCCAGGAGCCAGATGTAGCC
AAGGACTGTGTCCAGCTGAGGACAAAGCTGGCGCTCAAGGTCACTCTGTAAAGCCAGAGTAAACAAAGCGCTGATC
CAATGTGCTGTGTAGGATTTCTGTGATTTTCTCGGGCTCAAGAGAAACCCGAGACATCTACACTGTCTCT
TTTCAACCACACCCCGATCCCTAGGTGAGSAGAACGCGCTGAAGCAGGCTCCATTCAATTCAACACACATGACC
ACCGCTGTGATCTTGAACAAGAGGCCAATCTCACTTCGCTTGGTTTCTTATCTGTAATAATGAGACCACTTAT
TGCTGACTTCAAGGGCTGTGTGAGGATTAATGAGATGA

SEQ ID NO 5

KLK 15 mRNA SPLICE 3 structure (1581..1623, 5259..5412, 5913..6078,
7127..7786)

ATGTGGCTTCTCCTCACTCTCTCCTTCTGCTGGCACTCCACAGCAGCCAGGATGGTACAAAGTTGCTGGAGGGTG
ACGAGTGTGCACCCCACTCCAGCCATGGCAAGTGGCTCTCTACGAGCGTGGACGCTTAACTGTGGCGCTTCCCT
CATCTCCCACTACCTGGGTGCTGCTGCGGCCCACTGCGCAAGCGCTTCTATGAGAGTGGCGCTGGGAGACACAAC
CTGGCCAAAGCGGATGGCCAGAGCACTACGAGCCAGCTCTCGGTCATTCCACACCCCGCTAGAGAGCGGCA
GCCACCGCAACGACATCATGTGCTGCGCTTAGTCCAGCCCGCAGCGCTGAACCCCAAGGTGACTGTGGGGGACC
CCTGTCTGTGGGGGCATCTCTGAGGSCATTTGTCTCTGGGTTGACCTCCCTTGTGACACACCAACCAAGCTGGT
GTCTATACCAAGTCTGCCACTACTTGGAGTGGATCAGGAAACCATGAAGAGGACTGACTATTCTAGCCTATCT
CTGTATCCCTTGACTGAGCAGAAAGCCCAAGCTGGCCAGCAGCCCGCTGACATGGAACAGAACGGAGCCATC
CCCAAGACCTCTCTCAAGGCCAGATGTTAGCCAGGACTTGTCCACCTGAGGACAAAGCTGGCGCTCAAGGT
ACCTGTCTTAATCCCAAGATACAAAGCGCTGATCCAGTTGCTCTGTAGGAATTTCTGTGACTTPTTCTGGGGTC
AAGAGAAACCCCGAGACACTGTACAGTGTCTTTTCAACCACCCCGATCCCTAGGTGAGGAGAGCGGCTT
GAAGCAGGGCTCCATTCAATCAACACATGACCACCGTGTGATCTTGAACAAGAGGCCAATCTCACTTCCGCT
TGGTTTCTTATCTGTAATAATGAGACCATCTTATCTGACTTCAAGGGCTGTGTGAGGATTAATGAGATGA

SEQ ID NO 6

KLK15 protein

MMLLLTSLFLASTAAQDGDKLLSGDECAPHSQFWQVALYHRGRFNGASLISPHMVLAAHCQSRFMRVRLGEHN
LRKRDGPQLRTTSRVIPHPRYEARSHRNDIMLLRLVQPARLNPQVRAVLPTRCPPGBACVVSQWGLVSHNEPG
TAGSPRSQVSLPDTLHCANISIIISDTSCKSTYGRLATWVMVCAGBGRGABSCBDSGGFLVCGGLLQGITVSWGIV
FCDWTFKPGVTKVCHYLEWTFETMKRN

SEQ ID NO 7

KLK15 splice variant 1

MMLLLTSLFLASTAAQDGDKLLSGDECAPHSQFWQVALYHRGRFNGASLISPHMVLAAHCQSRFMRVRLGEHN
LRKRDGPQLRTTSRVIPHPRYEARSHRNDIMLLRLVQPARLNPQ

SEQ ID NO 8

KLK15 splice variant 2

MMLLLTSLFLASTAAQDGDKLLSGDECAPHSQFWQVALYHRGRFNGASLISPHMVLAAHCQSRFMRVRLGEHN
LRKRDGPQLRTTSRVIPHPRYEARSHRNDIMLLRLVQPARLNPQVRAVLPTRCPPGBACVVSQWGLVSHNEPG
TAGSPRSQ

PCT/CA01/01141

SEQ ID NO 9

KLK15 splice variant 3

SEQ ID NO 10

HNEPGTAG

SEQ ID NO 11

5' Untranslated

1-1580

SEQ ID NO 12

Exon 1

1581-1623

ATGTGGCTTCTCCTCACTCTCTCCTTCCTGCTGGCATCCACAG

SEQ ID NO 13

Intron 1

PCT/CA01/01141

1624-5258

5413-5912

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

7/12

GTATGAAAGCAGGGGCTCAGGGTCTGAGGAGGCTGGTTCCGGGGGAAGAGCTCCTAGATTGGGGGAAGACGGA
GGCAGACGCCAGAACTCTGGGTTCTGAAGAAGCAGGAGGCCGGATGTCAAGCCCTGGGTTAGGAAGGATGTGT
GTTTCAAGCCCTTCGATCTCTGAAGGAGGAAGGAGAAGACTAGTTCAGGCTTTTGAGCTCAGTCTTAGGGATGTG
AGAATCCTGGATTCCGGGACAGACAGGAGGGGGCTGGGAGTAGTTGGAGGGATCGAGTCTTAGGAGTATGCTTG
ACTCAGACTCTGTTGGTCTCTGAGGAGCAGGGGCTGGAAACCATTTGGCTTCAGGGTCTTGGGARAAGGTATGSGAT
GTCGAGATTTCATAAGGCTCGGGAGACCTCGGGTTGCCACCTTTGATCTTTCTGTCTCTACTTGGGGTAAAC
ACTGSCCTGCATCCACTGGCGGAAACCACTCGCCGACAG

SEQ ID NO 16

Exon 3 (Classic and Splice Variant 2)

5913-6196

cttcctga gagtgcgctt gggagagcac aacctgcgca agcgcgatgg cccagagcaa ctacggacca
cgtctcgggt cattccacac ccgcgctacg aagcgcgcaag ccacgcgaac gacatcatgt tgcgtgcctt
agtccagccc gcaagcctga acccccaggt gcgccccgca gtgctaccac cgcgttgccc ccacccgggg
gagggcctgt tgggtgtctg ctggggcctg gtgtcccaac acgagcctgg gacgcctggg
agccccggt cacaag

SEQ ID NO 17

Intron 3 - Classic and Splice Variant 2

6197-6316

tgc gtgaaggat gtagctgat gtagggctc aaggaatcta tgcctcagg ctcttgggag
gaggggaca agggccggaa ttatggatc tgcctcagctcactgtctt cccag

SEQ ID NO 18

Exon 3 - (Splice variant 1 and 3)

5913-6078

CTTCATGAGATCGGCTGGGAGAGCAAACTGGCGAAGCGCGATGGGCCAGAGCAACTACGGACCACTGCTCGG
GTCAITTCACACCCGCGCTACGAAGCGCGAGCCACCGCAACGACATCATGTTGCTGCGCTAGTCCAGCCGAC
GCTGAACCCCAAGGTGCGCCCGCGGTGCTACCCACCGGTGCCCCACCCGCGGAGGCTGTGTGTGTCTGG
CTGGGGCTGTGTCTCCACAACGAGCTTGGACCGCTGGGAGCCCCCGGTCAAG

SEQ ID NO 19

Intron 3 - (Splice variant 1 and 3)

6079-6316

GTGCGTGAAGGATGGAGCTGGATGCGAGGCTCAAGGAATCCTATGCTCCAGGGCTCTTGGCGGAGGGGACAAG
GGCCGGAATTATGGATCTGCTCCAAAGTCCACTGTCTTCCCAAG

SEQ ID NO 20

Exon 4

6317-6453 (Classic and Splice Variant 1)

TGAGTCTCCAGATACGTTCATTTGTGCCAATCAGCATATCTCGGACACATCTGTGACAGAGCTACCCAGG
GCGCTGACAAACACCATGTTGTGTGCGAGCGCGGAGGCGAGAGGCGCAGAATCTGTGAG

SEQ ID NO 21

Intron 4 (Classic and Splice Variant 1)

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

8/12

6454-7126

GTCTAGAGCCCTAGAGGGSCCATCAGGCGGAAGAGAGGGATGGGGACAGGTGTGGGAGTCCGGATGGGGTTGGATT
TCTTTTCCTTTGGGCCAGAGAAAGATGCTAGGGTTAGGCTTTGGAGATGGAGTAGGAAGAGAAAGTTAGAAATAGGGGTGA
GGTTGGAGTTGGGGTTATAGGTGGGGATTGCGTTGTTTGGGGTGGATAAAGTGTGATAGTTAGTTTGGAGATGGCATG
GTTTGGGGTTGAGAAATGGGAATGGTTTGGTTTGAATCTGGGTGGGAAATACGTGAGGTTGAATTTGGATGGAGTA
GATTTTGGTTGGATGCAAGAGCAAGAGATTGAGATTGGATTTTGGATGGGCAATGGGTTTGAATTTGAATTTGA
ATGGTGGAGATTGGGGCTGAGTTGGAATTAATCTAGTACAGTTGCACTGGAGTTGCAATGGGGTTGAGATTGGAATP
AGGTTGGGTGAGTTGATATGAGCTGTGTGAAATGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGTTGGCTCTGTTTGGGATAAAC
TGGGCTGTATTTGAGTTGAGTTGGTTGGGGTTCCCTGGGATGGGGATGGATTGGGTTGGGGTGGAGATTGCAAAATG
GTGATTAGGATGAGGATGAATCCAGGAGGTTTCACTCAACTGAGACCCCTCTTTTCCCAAG

SEQ ID NO 22

Intron 4 (Splice variant 2 and 3)

6079-7126

T GCGCCCGGCG GTGCTACCCA CGGTTGCCC CCACCCGGGG GAGGCTGTG TGGTGTCTG
CTGGGCTTG GTGTCCACA ACGAGCTGG GACCGCTGG AGCCCCGCT CACAGGTGC GTGAAGGAT
GAGGCTGGAT GCGAGGCTTC AAGGAATCCTATGCTCCAGG GCTCTTGGGC GAGGGGACA AGGGCCGGAA
TTATATGATC TGTCCAAAT CCACGTGCTT CCCCAGTGG TCTCCAGAT ACGTTGATT GTGCCAACA
CAGCATATATC TCGGACACAT CTTGTACAAA GAGCTACCCA GGGCGGCTGA CAACACCAT GTGTGTGCA
GGCGCGGAGG GTCAGAGGCG AGAATCCTGT GAGGTACAG CCTAGAGGG CCATCAGGC GAGGAGGAG
ATGGGACA GGTGTGGGAG TCCGATGGG GTTGGATTTT CTTTCTTTG GCGCAGAGAA GATGCTAGGG
TTAGGCTTGG AGATGGAGTA GSAAGGAAG TTGAATAGG GGTGAGGTTG GAGTTGGGGT TATGGTTGG
GATTCGCTG TTTGAGGTG APTACTGGA TAGTTAGTTT GAGATGGAT GGGTTGGGT TGAAGATGG
ATGGTTTGG TTTGATCTG GGTGGGAAAT ACCTCAGGGT TGAATTTGGA TGAGGTAGAT TTTGTTTGA
ATGCAAGAA CATGAAGATT GAGATTGGAT TTTGAGATGG GCAATGGGTTT GATTTGATTT TGAATGGTGA
GGATTTGGGC TGAGTTGGAT TTAATTTAGT ACAGTTGCAC TGGAGTTGCA TGGGGTTGAG ATTGGATATA
GGTTGGGTGA GTTGTATTGA GCTGTATTGA ATTTGGGGTT GGGTTGGGT TGGGTTGGCT CTGTTTGGGA
TAAATCGGC TGTATTGAT TGAGTTGGT TGGGGTTCCC TGGGATGGG ATGGATTGGG TTTGGGGTGA
GATTGCATAT GGTGATTAGG ATGAGGATGA ATCAGGAGG TTTTCACTCA CCTGAGACC CTTCTTTTCC
CCACAG

SEQ ID NO 23

Exon 5

7127-7786

GGTGACTCTGGGGACCCCTGGTCTGTGGGGCATCTGCAGGGCATGTGTCTCTGGGTGACGTCCCTTTGTGACA
ACACCACCAAGCCTGGTGTCTATACCAAAGTCTGCCACTACTTGGAGTGATCAGGGAAACCATGAAGAGGAAC/TG
ACTATTTCTAGCTATCTCCTGTGCCCCTGACTGAGCAGAGGCCUCCACAGCTGGCCAGCAGCCCCGCTTGAATGG
ATCAGACAGAGGCTATCCCCAAGAGCCCTGTCAGGCCAGATGTAGCCAGAGACTTGTCCCACTGAGAGACAA
AGCTGGGCTCAAGGTCACCTGTTTAAATGCCAAGATACAAAGGCTGATCCAAAGTTGCTCTGTAGGAATTTCTGT
GACTTTTCTGGGGTCAAGAGAAACCCGAGACATGTACACTGTTCCTTTTCAACCCACCAACCCGATCCCTAG
GTGAGGAGAGGCGGCTTGAAGAGGGCTCCATTCATTCACACACATGACCACCCGTGTGATCTTGAACAGAGGC
CCAACTCTACATTCGCTTGGTTTCTTATCTGTAAAAATGAGACCATCTTATTTGCTGACTTCAAGGGCTGTGTGGA
GGATTAAATGAGATGATTCGTCTGAATGATTAATAATCGTGTCTGGCACTGA

SEQ ID NO 24

7127-7279

GGTGACTCTGGGGACCCCTGGTCTGTGGGGCATCTGCAGGGCATGTGTCTCTGGGTGACGTCCCTTTGTGACA
ACACCACCAAGCCTGGTGTCTATACCAAAGTCTGCCACTACTTGGAGTGATCAGGGAAACCATGAAGAGGAAC/TG
A

SEQ ID NO. 25

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

9/12

Zyme

MKRLMVLSLIAAAWAEQNKLVHGGPCDKTSHFYQAALYTSGHLLCGGLVLIHFLMVLTAAHCKKFNKLVFLGRHN
LRQRESSQEQSSVVRAVIHPDYDAASHDDIMLLRLARPAKLSBLIQPLFLERDCSANTTSHILGWGTADGDFP
DTTQCAVILVSRBECCHAYFGQTTQNMLCAGDEKYGKDSQGDSSGGLVCGDHLRGLVSWGNI PCGSKKPGVYT
NVCRYTMWIKRTQAK

SEQ ID NO. 26

KLK-L4

MWPLALVIASITLALSGGVSQSSKVLNTWTSGLPGGYTCFFHSQPMQAALLVQGRLLCGGLVHPKMWLTAAH
CLKBLKVLGRHALGRVEAGBQVREVVHSIPPEYTRRSPTLHNDHNDIMLLELQSPVQJUGYIQTPLSHNRIT
FGTTCRVSGWTTTSTFQVYFPHLQCANTQLRDEBECQVTFPGKITDMMLCAGTREGGKNSCBGDSGGPLVCNRTL
YGLVSWGDFPCGQPDRLPGVYTRVSRVLMIRETIRKYBFIQQQRWLKGPQ

SEQ ID NO. 27

KLK-L6

MPLLLTALQVLAIAMTQSQDENKTIIGGHTCTRSSQPMQAALLA
GPKRRFLCGGALLSGQWVITAHCGRFPILOVALGKHMLRRWEATQQLRVVRQVTHFNYSRTHDNDIMLLOQP
ARIGRAVRPIETVQACASPGTSCRVSQWGTLSSTIARYPASLQCVINISPDVVCQKAYPRITITPGMVCAQVPQGG
KDSQGDSSGGLVCRGQLQGLVSWGMRICALPGYPGVYTNLCYRSWIEETMRDK

SEQ ID NO. 28

TLSP

MQRLEWLNDWKSGRGLTAAKEFGARSSPLQAMRILQLILLALATGLVGGETRIKGFCEKPHSQPMQAALPEKTR
LLCGATLIAFRMLLTAHCLKPRIVVHVGHNLQKEGCBQTRTATESFPHPGFNNSLPNKDHNDIMLVKMASPV
SITWAVRPLTLSSRCVTAGTCLISGWGSTSSPQLRPLPHTLRANITIIHQKCEWAYPGNITITMVCASVQEGGK
DSQGDSSGGLVCNQLQGLISWQDPCATRKPGVYTRVCKYVDWIG

SEQ ID NO. 29

KLK-L3

MKLGILLCALLSLAGHGWDTRATGAEECRFNSQPMQAGLFHLTRLFOGATLISDRWLLTAHCKRPFYLMVRLGEH
HIAFWEGEPQLFRVTDTPHPGFMDLSANDHNDIMLIRLPAQARLSPAVQPLMLSQTCVSPGMCCLISGWAGVS
SPKALFPVTLCCANISILENKICHWAYFGHISDSMLCAGLWEGSGSCQGDSSGGLVCMGTLAGVWSGGRPCSRP
RRFAYVTSVCHYLDWIGETIMEN

SEQ ID NO. 30

NES1

MRAPHHLISAASGARALAKLLPLMAQLWAARAALLPQNDTRLDPHAYGAPCARG SQPMQVSLFNGLSFH
CAGVLVDQSWVLTAAHCGMKPLNARVGDDH LL-LLQG-BQLRRTT RSVVHPKYHQSGGPI LPRRTDHDIML
LKLARPVV-PGERVR ALQLPYR-CAQPGDQ CQVAGWGTAAARRVK YNKGUTCSSITILSP
KCEVFVFGVVTMMH ICNGLDR-GQDPCQS DSGGFLVCDETLQGI LSWG-
VYPCSSAQHPAVYTQICKYMSWINK VIRSW

SEQ ID NO.31

KLK-L5

MGLSIFLLCVLGLSQAATPKIFWTECGRNSQPMQVGLFEGTSLRCGGVLIDHRWVLTAAHCSGSRVWVRLGRHS
LSQLDWTETQIRHSGFSVTHFGYLCASTSHEHDLRLRLPLFVRVTSSVQPLEPNDCATAGTCHVSGWGITNHPR
NPPFDLLQCLNLSIVSHATCHGVVPGRITSNMCAGGVFGQDACQGDSSGGLVCGGLVQLGLVSWGVSQVPCGQDGIP

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

10/12

GVITYICKYVDWIRMIRNN

SEQ ID NO. 32

Neuropsin

MGRPRPRAAKTWMFLLLLGGAWAGHSRAQEDKVLGGHECOQHSQPWQAALFQGQQLLCGGVLVGGNMVL/TAHCKK
PKYTVRLGSHSLQNKDQPEQEI PVVQSI PHPCYNSSDVEDHNDLMLLQLRDQASLGSKVKPTISLADHCTQPGQKC
TVSGWGTVTSFRNFPPDILMCAEVKIPFQKCEDAYFGQITDGMVCASSSGADTCQGSGGPLVCDGALQGITSW
GSDPCGRSDKFGVYTNI CRYLDNIRKLIIGSEK

SEQ ID NO. 33

PSA

MNVFVVFLTL SVTWIGAAPLILSRIVGGWECREKHSQPWQVLVASRGRVCGGVLVHPQWVL/TAHCLIRNKSIVLLG
RHSLFHPDPTGQVFQVSHSFPFHYDMSILKNRFLRPGDDSSHDMLLRLSEPAEL/IDAVKMDLPTQEPALGTTC
YASGWGSI EPEFLTFKQLQCVDLHVISMVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWITGKSTCSGDSGGPLVCGVLCGITS
WGSFPCALPERPSLYTKVHYRKMIDTIVANP

SEQ ID NO. 34

HK2

MWDLVSLIALSVQCTGANVPLIQSRIVGGWECREKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVIVHPQWVL/TAHCLIKNSQVWLG
RHNLFEPEPTGQVRVVSHPFPHLYMSLLKHQSLRPDEDSSHDMLLRLSHPAKITD VVKVLGLPTQEPALGTTC
YASGWGSI EPEFLRPRSLQCVSLHLLSNDNCARAYSEKVTBFMLCAGLWTCGRDTCGGDSGGPLVCGVLCGITS
WGSFPCALPERPAVYTKVHYRKMIDTIAANP

SEQ ID NO. 35

HK1

MWFLVLCALSLGGTGAAPFIQSRIVGGWECREKHSQPWQAALYHFSTFCQGGILVHRQWVL/TAHCLISRYQLMLG
RHNLFDDENTAQFVHVSESPFHPGFNMSLLENFTRQADBDYSHDLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTERPEVSGST
CLASGWGSI EPEENFSPPDULQCVCLKILFNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSGGPLMCDGLVLCGVT
SWGYVPCGTFNKFPSVAVRVLSTYKWIETIAENS

SEQ ID NO. 36

KLK-L2

MATAPPPFMWFLCALITALLGVTEHVLANNFVSCDHPSNYTPSSGWDLGAGAGEDARSDDSSRIINGSDCDMH
TQPWQAALLLEPNQLYCGAVLVHPQWVL/TAHCRKIKVFRVLGHYSLSPVYSGQGMFGVKSI PHPGVSHPGHSN
DLMLIKLNRIRRTKIDVRFINVSCHPSAGTEKCLVSGWCTTKSPQVHF PKVLQCLNISVL SOKRCEADAYPRQIDDT
MFCAGDKAGRDSQQGDSGGPVVCGSLQGLVSWGDYPCARPNRPGVYTNLCKPTKWIQETIQANS

SEQ ID NO. 37

protease

MATAGNPWGNFLGYLLGVAGSLVSGSCSQIINGEDCSPHSQPWQAALVMEHELFCSGVLVHPQWVL/TAHCFQNS
YTI GLGLHSLBADQEPGSDQVVEASL SVRHPEYNRFLANDMLIKLDESVSSTIRSI SIASQCPTAGNSCLVSGW
GLLANGRMPTVLQCVNVSUVSEVCSKLYDFLYHPSMFCAGGGHDQKDCNWDGGFLICNGYLQGLVSVFGRAPCG
QVGVFGVYTNLCKFTENITKIVQAS

SEQ ID NO. 38

HSCCE

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

11/12

MARSLLLPQLLLSLALETAGEEAQDEKIIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCHSCCBGGVLVNERWVLTAHCKMNEYTVHLGSDTLGDRRAQRKASKSRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPFGTCTTVSGWGTITSPDVPFDLMCDVKLISPQDCTKVYKDLLENSMLCAGIPDSKINACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQFNDPFGVYTQVCKPTRWINDTKRHR

SEQ ID NO 39

CACACGAGCCTGGGACCGCTGGG

SEQ ID NO 40

ATTAA

SEQ ID NO 41

Table 1 KIK1-A

ATCCCTCCATCCCATCTTT

SEQ ID NO 42

Table 1 KIK1-B

CACATACAATTCTCTGGTTC

SEQ ID NO 43

Table 1 KIK2-A

AGTGACACTGTCTCAGAAATP

SEQ ID NO 44

Table 1 KIK2-B

CCCCAATCTCACGAGTGCAC

SEQ ID NO 45

Table 1 E5-A

GTCGGCTCTGGAGACATTTC

SEQ ID NO 46

Table 1 E5-B

AACTGGGGAGGCTTGAGTC

SEQ ID NO 47

Table 1 KIK15-F1

CTCCTTCCTGCTGGCATCCA

SEQ ID NO 48

WO 02/14485

PCT/CA01/01141

12/12

Table 1 KKK15-R1
ATCACACGGGTGGTCATGTG
SBQ ID NO 49
Table 1 KKK15-F2
CAAGTGGCTCTCTACGAGCG
SBQ ID NO 50
Table 1 KKK15-R2
GACACCAGGCTTGGTGGTGT

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



PCT

WO 02/014485 A3

(72) **Inventors; and**
(75) **Inventors/Applicants (for US only):** YOUSEF, George, M. [EG/CA]; 50 Stephanie Street, Suite 1701, Toronto, Ontario M5T 1B3 (CA). DIAMANDIS, Eleftherios, P. [CA/CA]; 44 Gerrard Street West, Suite 1504, Toronto, Ontario M5G 2K2 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA01/01141

(22) **International Filing Date:** 10 August 2001 (10.08.2001)

(25) **Filing Language:** English

(26) **Publication Language:** English

(30) Priority Data:
60/224,853 11 August 2000 (11.08.2000) US

(71) **Applicant** (for all designated States except US): **MOUNT SINAI HOSPITAL** [CA/CA]; 600 University Avenue, Suite 970, Toronto, Ontario M5G 1X5 (CA).

(72) **Inventors; and**
(75) **Inventors/Applicants (for US only):** YOUSEF, George, M. [EG/CA]; 50 Stephanie Street, Suite 1701, Toronto, Ontario M5T 1B3 (CA). DIAMANDIS, Eleftherios, P. [CA/CA]; 44 Gerrard Street West, Suite 1504, Toronto, Ontario M5G 2K2 (CA).

(74) **Agent:** **BERESKIN & PARR**; 40 King Street West, Box 401, 40th Floor, Toronto, Ontario M5H 3Y2 (CA).

(81) **Designated States (national):** AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FG, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LI, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: KALLIKREIN GENE

[illegible]

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid molecules, proteins encoded by such nucleic acid molecules; and use of the proteins and nucleic acid molecule.

WO 02/014485 A3

WO 02/014485 A3



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
9 January 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.

Published:

— with international search report

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					International Application No. PCT/CA 01/01141
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C12N15/57 C12Q1/68 A61K38/48	C12N9/64 C12Q1/37	C12N1/21 A61K48/00	C12N5/10 A61K39/395	C07K16/40 A61K31/7088
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q A61K					
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, WPI Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	DIHANICH MELITA ET AL: "A novel serine proteinase-like sequence from human brain." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1218, no. 2, 1994, pages 225-228, XP008008643 ISSN: 0006-3002 the whole document				I-11, 14-18
X	DATABASE EBI 'online! 6 January 2000 (2000-01-06) Database accession no. AW274270 XP002214467 the whole document				I-11, 14-18
-/-					
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search 25 September 2002			Date of mailing of the international search report 10/10/2002		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel: (+31-70) 540-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 540-3016			Authorized officer Van der Schaal, C		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/CA 01/01141

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EBI 'Online! 3 April 2000 (2000-04-03) BIRREN B ET AL: "Homo sapiens chromosome 19 clone" Database accession no. AC027602 XP002214468 abstract	1
E	WO 02 00860 A (SUGEN INC.;WHYTE DAVID (US); CAENEPEEL SEAN (US); CHARYDCZAK GLEN) 3 January 2002 (2002-01-03) SEQ ID no 31 and 90 claims	1-28
E	WO 02 08396 A (INCYTE GENOMICS INC.) 31 January 2002 (2002-01-31) PRST-3: SEQ ID NO3 and SEQ ID NO 24 claims	1-28
P,X	YOUSSEF GEORGE M ET AL: "Molecular cloning of the human kallikrein 15 gene (KLK15): Up-regulation in prostate cancer." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 1, 5 January 2001 (2001-01-05), pages 53-61, XP002214465 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-28
P,X	TAKAYAMA THOMAS K ET AL: "Activation of prostate-specific antigen precursor (pro-PSA) by prostin, a novel human prostatic serine protease identified by degenerate PCR." BIOCHEMISTRY, vol. 40, no. 6, 13 February 2001 (2001-02-13), pages 1679-1687, XP002214466 ISSN: 0006-2960 the whole document	1-28

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 01/01141

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/CA 01 01141

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 20 21 26-28 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 12 13 and 19 are (partially) directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Present claims 20-23 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being able to interact with KLK15.

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound/method/apparatus by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating antibodies against KLK15.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersIn **Original Application No**
PCT/CA 01/01141

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200860	A	03-01-2002	AU 7142701 A 08-01-2002 WO 0200860 A2 03-01-2002 US 2002064856 A1 30-05-2002
WO 0208396	A	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 13/08	4 C 0 8 4
A 6 1 P 13/08	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 5
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 15/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 16/40	
C 0 7 K 16/40	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 9/64	A
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/37	
C 1 2 N 9/64	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/37	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	Z
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ジョージ・エム・ユゼフ
カナダ、エム5ティ・1ピー3、オンタリオ、トロント、スウィート1701、ステファニー・ストリート50番

(72)発明者 エレフテリオス・ピー・ディアマンディス
カナダ、エム5ジー・2ケイ2、オンタリオ、トロント、スウィート1504、ジェラード・ストリート・ウエスト44番

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 BA14 CA04 DA02 EA04 GA11 HA01
4B050 CC01 CC03 DD11 LL01 LL03
4B063 QA18 QA19 QQ36 QQ44 QS25 QS34
4B065 AA90X AA99Y AB01 AC14 BA02 CA33 CA44
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA14 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23
BA44 CA53 CA56 CA59 NA14 ZA662 ZA812 ZB262
4C085 AA03 BB01 BB11 CC21 CC32 EE01 GG01
4H045 AA11 BA10 CA41 DA75 EA51 FA74