

P0107811

Korin, a szerinproteáz

A2

KIVONAT

A találmány egy új szerinproteáz génre, úgymint a humán és egér korin génjére és a korin polipeptidre vonatkozik. A korin egy vagy több frizzled domént, LDLR-t, scavenger receptor cisztein-gazdag ismétlődést és szerinproteáz katalitikus doméneket tartalmaz. A találmány tárgyát képezi továbbá a szerint kódoló gént tartalmazó vektor valamint az az eljárás is, mellyel a polipeptidet rekombináns úton előállítják.

A találmány a korin polipeptid szerinproteáz katalitikus aktivitását módosító modulátorok azonosítási eljárását is magában foglalja.

P. G. (M)

2001.04.13.

Korin, a szerinproteáz

A találmány egy új génre, egy szerinproteáz génjére, különösen az emlős szerinproteáz, úgymint a humán és egér korin génjére, ennek nukleinsavaira, polipeptidjeire és ezek fragmentumaira vonatkozik. A korin egy vagy több frizzled domént, LDLR-t, scavenger receptor cisztein-gazdag ismétlődéseket és szerinproteáz katalitikus doméneket tartalmaz. A találmány tárgyát képezik továbbá azok az eljárások is, melyek ezeket a nukleinsavakat és polipeptideket a gyógyászatban, diagnosztikában és a kutatásban alkalmazzák. Például a korin nukleinsavai és polipeptidjei olyan eljárásokban használhatók fel, melyek aktivitásának modulátorait azonosítják, valamint állatmodellekben az emberi betegségek utánzására és patológiás állapotok diagnosztizálására alkalmazhatóak.

A szerinproteázok egy sor különböző fejlődési és élettani folyamatban részt vesznek [Stroud R., Sci. Am. 231, 74-88 (1974); Neurath H., Science 224, 350-357 (1984)]. Például a szerinproteázok részt vesznek a sejtes jelátvitelben, sejtdifferenciációban és az előhormonok biológiailag aktív formáinak kialakításában. Lásd például Hong és Hashimoto művét [Cell 82, 785-794 (1995)] és Inagami művét [J. Biol. Chem. 264, 3043-3046 (1989)].

A Szekvencialista és az ábrák rövid ismertetése

Az 1. szekvencia a humán korin nukleotidszekvenciáját mutatja

be.

A 2. szekvencia a humán korin levezetett aminosav-szekvenciáját mutatja be.

A 3. szekvencia az egér korin nukleotidszekvenciáját mutatja be.

A 4. szekvencia az egér korinból levezetett aminosav-szekvenciát mutatja be.

Az 1. ábra egy humán korin polipeptiden belül a funkcionális domének elrendezését ábrázolja.

A 2. ábra a humán korin polipeptidből származó frizzled domének ("Corin Crd1" és "Corin Crd2") aminosav illesztését mutatja be a Frizzled-del, Fz-1-gyel és lin-17-tel.

A 3. ábra a humán korin polipeptidben azonosított LDLR-ismétlődések aminosav-szekvencia illesztését mutatja egy humán LDLR konszenzus szekvenciával.

A 4. ábra humán korin szerinproteáz domén ("Korin") aminosav-szekvencia illesztését mutatja a három másik fehérjében jelen lévő szerinproteáz doménnel. A KAL a kalkrein, ENK az enterokináz, és TRP1 a tripszin.

Olyan nukleinsav- és polipeptid-szekvenciákat azonosítottunk, melyek a korint, egy transzmembrán/szignál peptidet, frizzled doméneket, kis sűrűségű lipoprotein receptor ismétlődéseket (LDLR), scavenger receptor ciszteinben gazdag ismétlődéseket (SRCR) és szerinproteáz katalitikus domént tartalmazó fehérjét kódoló új gén. (Lásd például az 1. ábrát).

A találmány értelmében egy korin polipeptid egy korinra specifikus immunogén aktivitással rendelkezik; vagy olyan aminosav-szekvenciájú, mely egy természetben előforduló forrásból nyerhe-

tő ki, és a következő aktivitások vagy domének közül eggyel vagy többel rendelkezik: egy szerinproteáz katalitikus aktivitás; egy szerinproteáz katalitikus aktivitású domén; egy szerinproteázt kötő szubsztrát aktivitás; egy proatriális nátriuretikus faktor (ANF) átalakító enzim katalitikus aktivitás; egy frizzled domén; egy LDLR ismétlődési domén; és scavenger receptor ciszteinben gazdag ismétlődések (SRCR).

Előnyösen a következő, Unigene adatbázisból (PubEST) származó nukleinsav-fragmentumok által kódolt polipeptid fragmentumok ki vannak zárva: Hs.62794 (AA126468 [1686098], AA126648[1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137] és AA046793 [1524691]) és Hs.71798 (AA147031 [1716421]). (A zárójelben lévő számok a PubEST adatbázisra utalnak). Adott esetben a következő fragmentumok szintén ki vannak zárva: Hs.121626 (AA7711958), Hs.1657 (M69297), és Hs.47712 (AA203291), g1231787; g1312726; g1337948 és g942724. A fent említett nukleinsavak nukleotidszekvenciáit a nyilvánosan hozzáférhető adatbázisokban keresve azonosíthatjuk. Mindemellett az ezeket a szekvenciákat magukban foglaló vagy tartalmazó polipeptideket nem zártuk ki, ilyen például a teljes hosszúságú korin, és egy olyan polipeptid, mely ezek közül az említett fragmentumok közül kettővel vagy többel rendelkezik, vagy egy olyan polipeptid, mely a fentebb említett fragmentumok közül eggyel és további, a korinból vagy más forrásból származó aminosav-szekvenciákkal rendelkezik.

Az "korinra specifikus immunogén aktivitás" kifejezés azt jelenti, hogy a korin polipeptid egy olyan immunológiai választ vált ki, ami szelektív a korinra. Egy ilyen válasz celluláris

vagy humorális lehet. Tehát specifikus immunogén aktivitás az antitestek, T-sejtek, makrofágok, B-sejtek, dendritikus sejtek, stb. stimulációja egy emlős korin polipeptid, például egy 2. és 4. szekvenciában bemutatott humán vagy egér korin közül kiválasztott korin-aminosavszekvencia által. Ezeket a válaszokat szokásos módon mérhetjük. Ezzel kapcsolatban lásd még a korinra specifikus antitesteket tárgyaló részt is lentebb.

A szerinproteáz katalitikus aktivitás azt jelenti például, hogy a korin polipeptid rendelkezik egy polipeptid-hasítási aktivitással, előnyösen egy peptidkötésnél, például ahol a korin egyik szerin-gyöke részt vesz a peptidkötés hasításában. Lásd például Stroud művét [Sci. Am. 231, 74-88 (1974)] és Kraut művét [Ann. Rev. Biochem. 46, 331-358 (1977)]. A 2. vagy 4. szekvenciában bemutatott teljes korin polipeptid szekvencia vagy egy része szerinproteáz katalitikus aktivitással rendelkezhet. A 2. szekvencia 801. pozíciója utáni hasítás (az arginin és az izoleucin közötti peptidkötés hasítása), mely a 802-1042. aminosav-pozíciókat tartalmazó vagy lényegében ebből álló katalitikus fragmentum felszabadulását eredményezi, megnövelheti vagy fokozhatja az ilyen katalitikus aktivitást.

A "szerinproteáz katalitikus aktivitású domén" egy polipeptid olyan régiójára vonatkozik, mely képes a fentebb leírt szerinproteáz katalitikus aktivitásra, de nem szükségszerűen rendelkezik, ha egyáltalán rendelkezik, a teljes aktivitással abban a háttérben, melyben jelen van. Például a tripszin család tagjai gyakran proenzimként expresszálnak, melyek csak egy, a polipeptidben lévő specifikus helynél történő hasítás után fejezik ki a teljes aktivitást. A hasítás egy proteolitikus fragmen-

tum felszabadulását eredményezi. Általánosságban a "felszabadult fragmentum" a fehérje fennmaradó részével diszulfid kötésekön át van rögzítve. Lásd például a 2. szekvenciát, melyekben a ciszteinek diszulfid-kötéseket tudnak kialakítani. A szerinproteáz katalitikus domén a proteolitikus fragmentumra vonatkozik, azelőtt, hogy az a teljes korin szekvenciából felszabadulna.

A "proatriális nátriuretikus faktort (ANF) átalakító enzim katalitikus aktivitás" például egy olyan katalitikus aktivitást jelent, melyben a pro-ANF proteolitikus hasítással egy vagy több kisebb peptiddé alakul. Lásd például a következő műveket: Inagami, J. Biol. Chem. 264, 3043-3046 (1989); Rosenzweig és Seidman, Ann. Rev. Biochem. 60, 229-255 (1991); Wilkins et al., Lancet 349, 1307-1310 (1997). Az ANF (ANP-ként is ismert) egy szív-hormon, mely például a testfolyadék-homeosztázist, vérnyomást, plazmatérfogatot és más a szív- és vesefunkció fiziológiai folyamatait szabályozza. A konvertáló aktivitás egyéb szubsztrátumai közé tartoznak az ANF homológjai és azok a fehérjék, melyek az ANF-fel homológok, mint például a BNP és CNP. Lásd például, Wilkins et al., Lancet 349, 1307-1310 (1997); Levin et al., New Eng. J. Med. 339, 321-328 (1988). A konvertáló aktivitást hagyományosan mérhetjük, például ahogy a példákban leírtuk, ahol a pro-ANF hasítását úgy mérjük, hogy kimutatjuk a különbséget a pro-ANF molekulatömegében a korinnal vagy a korin biológiailag aktív fragmentumával végzett kezelés előtt és után. Mivel a korin expresszálni képes a sejtfelszínen, ép sejteket használhatunk a szubsztrát, mint például a pro-ANF feldolgozására.

Az enzimkatalízisben az első lépésnek általában a szubsztrátkötést tekintjük, mivel a szubsztrátnak ligandumként

működve először az enzim felszínéhez kell kapcsolódnia, hogy lehetővé váljon, hogy az enzim végrehajtsa a katalitikus reakciót. Ezt az enzimfelszínt hívhatjuk az enzim aktív helyének. A szubsztrátnak az enzim-felszínhez való kötődése több kölcsönhatást foglalhat magában az enzimmel, például kémiai kötést egy vagy több olyan aminosavval és/vagy funkcionális csoporttal, melyet az enzim tartalmaz. A szerinproteáz szubsztrátkötő aktivitást a leírásban olyan jelentéssel használjuk, hogy a szubsztrát, például a (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl), S2444 (proGlu-Gly-Arg-pNA.HCl) illetőleg a S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl) vagy a pro-ANF specifikusan kapcsolódik egy korin polipeptid felszínéhez. Az enzimhez való kapcsolódás egy vagy több kölcsönhatáson keresztül mehet végbe, melyek a természetben előforduló szubsztrátját rögzítik hozzá, mindemellett egy olyan polipeptidnek akkor is lehet szubsztrátkötő aktivitása, amikor a természetben előforduló kölcsönhatásoknál kisebb számban és gyengébben köti a szubsztrátot. Egy szerinproteáz szubsztrátkötő aktivitás adott esetben abból a célból lehet hatásos, hogy: a szubsztrát katalízisét elérje, kompetitíven vagy nem kompetitíven kössön az aktív helyhez, irreverzibilisen kapcsolódjék az enzimhez, a katalitikus aktivitás elvesztését eredményezze (például ahol ez egy szuicid szubsztrát), stb.

A szerinproteáz szubsztrátkötő aktivitás hagyományos módon mérhető. Például egy kompetíciós kötési vizsgálat alkalmazható azoknak a szubsztrátoknak az azonosítására, melyek kapcsolódnak egy polipeptidhez, vagy annak származékához, például úgy, hogy hatásos körülmények mellett összekeverünk egy kimutatható markert tartalmazó szubsztrátot, egy humán korin polipeptidet vagy

egy fragmensét, és egy olyan vegyületet, melyet a szubsztrátkötő aktivitásra tesztelünk. A mérőeljárást folyékony közegben hajthatjuk végre, ahol a kötött és a szabad szubsztrátot egy membránnal választjuk el, vagy kívánt esetben végrehajthatjuk egy szilárd fázison. A szilárdfázisú mérőeljárásokat nagy teljesítményű eljárásokat alkalmazva hajthatjuk végre, például csipeken, lapkákon, stb. A szubsztrátkötés és a katalitikus aktivitás különválhat egymástól. Így a korin polipeptid szubsztrátkötő aktivitással rendelkezhet úgy is, hogy katalitikus aktivitása nincs.

Egy korin polipeptid egy Wnt kötőaktivitással rendelkező "frizzled-szerű ciszteinben gazdag domén"-t (vagy a leírásban használva frizzled domént) is tartalmazhat. Egy frizzled domén rendelkezhet egy ligandumkötő aktivitással vagy régióval, például ahogy Zorn meghatározta [Current Biology 7, R501-R504 (1997)]. Például a frizzled domén a Wnt-kkel homológ ligandumok és más olyan szekretált glikoproteinek receptoraként működhet, melyek a sejtproliferációban, sejt jelátvitelben., stb. részt vesznek. Membránkötött vagy szolubilis lehet. Szolubilis formában antagonistaként is hathat, például amikor a korin szabad frizzled doménje köti a szabad ligandumot, és meggátolja, hogy a neki megfelelő receptorral kölcsönhatásba lépjen a sejtfelszínen.

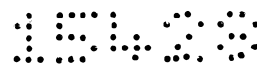
Egy LDLR ismétlődés egy 7. ábrán bemutatott humán LDLR konszenzus szekvenciát tartalmaz, és adott esetben ligandumkötő aktivitással rendelkezik.

Egy korin polipeptid tartalmazhat egy scavenger receptor ciszteinben gazdag ismétlődés domént ("SRCR"). Lásd például Matsumoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 9133-9137 (1990).

Egy emlős korin egy olyan emlős polipeptid, mely egy természetes forrásból kinyerhető aminosav-szekvenciával és az említett aktivitásokkal rendelkezik. Lehet teljes hosszúságú (azaz olyan, mint amit a 2. szekvenciában bemutatunk), vagy a teljes hosszúságúnál kisebb, és rendelkezhet az említett aktivitások közül eggyel vagy többel. Tehát magában foglalja a természetben előforduló normális, mutáns, polimorf, stb. szekvenciákat is. A természetes források közé tartoznak például az élő sejtek, például melyeket szövetekből vagy teljes szervezetekből nyerünk ki, tenyésztett sejtvonalak, ide értve a primer és halhatatlanná tett sejtvonalakot, biopszia-szövetek, stb.

A találmány egy teljes hosszúságú emlős korin, mint például a humán vagy egér korin fragmentumaira is vonatkozik. A fragmentumok előnyösen "biológiailag aktívak". A "biológiailag aktív" azt jelenti, hogy a polipeptid fragmentum aktivitással rendelkezik egy élő rendszerben vagy egy élő rendszer komponenseivel kapcsolatban. A biológiai aktivitások közé tartoznak az említett aktivitások, például egy katalitikus aktivitás, egy szubsztrátkötő aktivitás és/vagy egy immunogén aktivitás. A fragmentumok bármilyen kívánt módszer szerint előállíthatók, ide értve a kémiai szintézist, géntechnológiát, hasítási termékeket, stb. Ezeket lásd lentebb.

A találmány egy olyan humán korinra is vonatkozik, mely a levezetett, 2. szekvenciában bemutatott 1-1042. aminosavak szekvenciájával rendelkezik. Az 1042 aminosavas polipeptidnek a megjósolt molekulatömege körülbelül 116 kilodalton. Ez a következő doméneket tartalmazza: hidrofób régió körülbelül a 46-66. aminosav-pozíciókban; frizzled cisztein-gazdag domének körülbelül a



134-259. és 450-573. aminosav-pozícióknál; hét LDLR ismétlődés körülbelül a 268-425. és 579-690. aminosav-pozícióknál; egy ciszteinben gazdag régió körülbelül a 713-801. aminosav-pozícióknál, mely homológ egy makrofág scavenger receptor motívummal; és egy szerin proteáz katalitikus domén körülbelül a 802-1042. aminosav-pozícióknál. Az extracelluláris doménben tizenkilenc feltételezett N-glikozilációs hely van jelen, mely körülbelül a 67-1042. aminosav-pozícióknál található.

Egy találmány szerinti korin polipeptid, mely például a 2. vagy 4. szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciával rendelkezik, a rendelkezésre álló módszerekkel elemezhető, hogy más szerkezeti és/vagy funkcionális doméneket azonosítsunk a polipeptidben. Például egy korin polipeptid a következő művekben ismertetett módszerekkel elemezhető: Kyte és Doolittle, J. Mol. Bio. 157, 105 (1982); EMBL Protein Predict; Rost és Sander, Proteins 19, 55-72 (1994).

Egy humán korin körülbelül a 46-66. aminosav-pozíciókban lévő hidrofób doménjei membránhorgonyzó szekvenciaként szolgálhatnak. Lásd a hepszint, mely a tripszin család egy emlős szerinproteáza, mely egy transzmembrán domént tartalmaz az aminoterminális végének közelében [Kurachi et al., Methods in Enzymology 244, 100-114 (1994); a Stubble-stubloidot, mely egy *Drosophila melanogaster* szerinproteáz, és szintén egy transzmembrán domént tartalmaz [Appel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4937-4941 (1993)]. Közvetlenül a hidrofób és feltételezhetően transzmembrán domén előtt pozitívan töltött aminosavgyökök vannak, ami azt jelzi, hogy a korin egy II-es típusú transzmembrán fehérje lehet, melynek aminoterminálisa a

citoszólba ér.

A korin legalább kettő ciszteinben gazdag frizzled domént is tartalmaz körülbelül a 134-259. és 450-573. aminosav-pozícióknál. A 2. ábra a humán korin frizzled domének összehasonlítását mutatja az FZ-1-gyel, lin-17-tel és a Frizzled-del. A frizzled domén tartalmaz például egy ligandumkötő helyet. Lásd például. Zorn, *Current Biology* 7, R501-R504 (1997); Leyns et al., *Cell* 88, 747-756 (1997). Ahogy lentebb ismertetjük, a tárlálmány egyik tárgya azoknak a ligandumoknak az azonosítására vonatkozik, melyek a korin frizzled doménekhez kötődnek, és melyek adott esetben a korin polipeptidet kifejező sejtek aktivitását vagy a ligandumot kifejező sejtek aktivitását szabályozzák.

A korin fehérje szekvencia-analízise kimutatta, hogy az extracelluláris régióban két frizzled-szerű ciszteinben gazdag domén, hét LDL receptor ismétlődés, egy makrofág scavenger receptor-szerű domén, és egy tripszin-szerű szerinproteáz domén (A2) van. A két frizzled-szerű ciszteinben gazdag domén a 134-259. illetőleg a 450-573. aminosavaknál helyezkedik el. Ennek a két doménnek az aminosav-szekvenciája jelentős hasonlóságot mutat a *Drosophila* Frizzled fehérje extracelluláris ciszteinben gazdag doménjével, mely egy a gyümölcsleég egyedfejlődése alatt a polaritás meghatározásában létfontosságú hetes transzmembrán receptor.(19). A fizzled-szerű ciszteinben gazdag domének más fehérjékben is megtalálhatóak, mint például a Dfz2 a *Drosophilá*-ban (20), Lin-17 a *C. elegansban* (21) és az FZ1 az emberben (22). A két frizzled-szerű ciszteinben gazdag domén szekvenciái a korinban legközelebb a Lin-1-7-ben és FZ-1-ben lévő doménekhez

állnak. A tíz konzervatív cisztein maradék jelen van a korin frizzled-szerű ciszteinben gazdag doménjeiben.

A 268-415. aminosavak és az 579-690. aminosavak között hét ciszteinben gazdag ismétlődés van, melyek homológok az LDL receptor A osztályú ismétlődéseivel (23). Mindegyik ismétlődés körülbelül 36 aminosav hosszú, és hat ciszteingyököt valamint negatívan töltött aminosavak erősen konzerválódott csoportját tartalmazza. Az LDL receptorban ezek a ciszteinben gazdag ismétlődések kötik a kalcium-ionokat, és létfontosságú szerepet játszanak az extracelluláris ligandumok endocitózisában (23). Hasonló motívumokat találtak más membránreceptorok, mint például az LDL receptor-szerű fehérje (LRP1) (24), megalin (LRP2-ként vagy gp330-ként is ismert) (25), komplement fehérjék (26), enterokináz (27) és yolness és nudel *Drosophila* fehérjék (28, 29) extracelluláris doménjében.

A frizzled-szerű ciszteinben gazdag domének és az LDL receptor-szerű ismétlődések mellett egy másik ciszteinben gazdag régió is van a korinban a 713. és 801. aminosavak között. Ez a régió 88 aminosavat tartalmaz, és homológ a makrofág scavenger receptorban (31) megtalálható ciszteinben gazdag motívummal. Ez a motívum szintén jelen van a tengeri sün spermatozoa speract receptorban (31, 32) és a gerinces szerinproteázban, az enterokinázban (27).

A korin fehérje karboxil-terminális végén a 802. és 1042. aminosavgyökök között egy tripszin-szerű szerinproteáz domén található. Ez a proteáz domén erősen homológ a tripszin főcsalád tagjainak katalitikus doménjeivel. Például a korin aminosav-szekvenciája a prekallikreinnel 40%-ban (33), a XI-es faktorról

40%-ban (34), és a hepszinnel 38%-ban (35) azonos. A szerinproteáz szekvenciák összes lényeges tulajdonsága a korinban jól megőrződött. A katalitikus triád aktívhely gyökei a His843-nál, az Asp892-nél és a Ser985-nél találhatóak meg. A szubsztrátspecifikus zsebet kialakító aminosavgyökök az Asp979-nál, a Gly1007-nél és a Gly1018-nál helyezkednek el. Ezekről a gyökökről megjósolható, hogy kötik a P1 anyag maradékokat, mely alapján feltételezhető, hogy a korin a szubsztrátját bázisos gyökök, mint például lizin vagy arginin mögött hasítja. Továbbá egy feltételezett aktivációs hasítási hely található az Arg801-nél, mely azt sejteti, hogy a korin egy inaktív zimogénként szintetizálódik, és egy másik tripszin-szerű enzim szükséges az aktiválásához.

A proteáz doménben 12 ciszteingyök van. Összehasonlítva más alaposan tanulmányozott szerinproteázzal, mint például a tripszinnel és kimotripszinnel, megjósolható ezeknek a ciszteingyököknek a lehetséges párképződése. A tripszin főcsalád lényegében összes tagjában jelen lévő ciszteingyökök első három párja a Cys828-Cys844-nél, Cys955-Cys970-nél és a Cys981-Cys1010-nél helyezkedik el. A ciszteingyökök két további párja van jelen a Cys790-Cys912. és Cys926-Cys991. helyzetekben. A ciszteingyököknek ez a két párja általánosan megtalálható a két-láncú szerinproteázok alcsaládjában, mint például a kimotripszinben és a prekallikreinben (33). A Cys790 és Cys912 jelenléte azt jelzi, hogy az Arg801 aktivációs hasítása után a korin katalitikus doménje a molekula maradék részével összekapcsolódva marad egy diszulfidkötéssel. Érdekes módon egy további ciszteingyökpár is jelen van a korinban, a Cys817 és a Cys830.

Ebben a két helyzetben más szerin porteázokban nem található ciszteingyök a gerincesek körében. Egy adatbázisos keresés kimutatta, hogy az *Arenicola marina* tengeri gyűrűsféregből származó kimotripszinogén-szerű szerinproteáz két ciszteingyökkel rendelkezik a megfelelő helyzetekben (36). A korin proteáz-domén modelljét építettük fel a szarvasmarha kimotripszinogén A szerkezte alapján. Ez alapján a korinmodell alapján, ahol ennek a két ciszteingyöknek a C α atomjait rögzítve tartottuk az energiaminimalizálás alatt, az oldalláncok kénatomjai közötti távolság körülbelül 2,5 angström a rotamer keresés után. A modell azt jelzi, hogy ez a két cisztein valószínűleg két β -réteget összekapcsoló diszulfidkötést formál a proteáz domén magjában.

A humán korinszekvencia mellett egy másik emlős fajból, az egerből származó korint is klónoztuk és megszekvenáltuk. Az eger korin teljes hosszúságú nukleotid- és aminosav-szekvenciáját a 3. és 4. szekvenciában mutatjuk be. Az eger korinban 1113 aminosav van, és ugyanazokat a doméneket tartalmazza, mint a humán korin. 89%-os aminosav-szekvencia-azonosság van az eger és a humán korin között.

Emlős és nem emlős forrásokból egyéb korinhomológok állíthatók elő különböző módszerek szerint. Például az ilyen homológok szelektálására egy emlős korinra szelektív oligonukleotidot lehet alkalmazni, például úgy, ahogy Sambrook és munkatársai leírták [Molecular Cloning, 11. fejezet (1989)]. Az ilyen homológok a korinhoz képest változó mértékű szekvencia-azonossággal és hasonlósággal rendelkeznek. A nem emlős szervezetek közé tartoznak például a gerincesek, gerinctelenek, zebrahal, csirke, *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, gyűrűs férgek,

prokarióták, növények, *Arabidopsis*, vírusok, stb.

A találmány korinspecifikus aminosav-szekvenciákra, például egy olyan meghatározott aminosav-szekvenciára vonatkozik, mely különösen 2. és 4. szekvencia szerinti humán vagy egér szekvenciákban található meg, de nem korin polipeptidekből származó egyéb aminosav-szekvenciákban nem. Egy specifikus aminosav-szekvenciát szokásos módon találhatunk meg, például egy gén/fehérje adatbázisban keresve BLAST számítógépes programcsomaggal. Egy korinspecifikus aminosav-szekvencia peptidek antigénként való előállítására használható fel egy korinra specifikus immunválasz létrehozása céljából. Az ilyen immunizálással kapott antitestek specifikus próbaként alkalmazhatók egy emlős korin fehérjénél diagnosztikai vagy kutatási célokból.

Ahogy említettük, a találmány szerinti polipeptidek tartalmazhatják egy korin teljes kódoló szekvenciáját vagy annak fragmenseit. Hasznos fragmensek közé tartoznak például azok a fragmensek, melyek a frizzled domént, egy vagy több LDLR domént, SRCR ismétlődéseket, transzmembrán domént, szerin katalitikus domént vagy fragmenst tartalmaznak vagy lényegében abból állnak. A humán korin egy előnyben részesített fragmentuma a 2. szekvenciát tartalmazza, azzal a kikötéssel, hogy a fragmentum nem egy olyan polipeptid, melyet a Hs.62794 (AA126468 [168098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137], és AA046793 [1524691]), és Hs.71798 (AA147031 [1716421])). Lásd fentebb.

Egy korin polipeptid egy fragmense egy specifikus biológiai aktivitásra, például egy szerinproteáz aktivitásra, egy pro-ANF konvertáló enzimaktivitásra, egy szubsztrátkötő aktivitásra, egy

immunogén aktivitásra, stb. szelektálható. Egy hasznos fragmentumot szokásos módon, ezeknek a fragmentumoknak egy kívánt aktivitásra való tesztelésével azonosíthatjuk. Ezeknek az aktivitásoknak a mérését lentebb és a példákban írjuk le. Ezek a peptidek az EP 496 162 számú európai közrebocsátási iratban leírt módon is azonosíthatók és előállíthatók. Egy találmány szerinti polipeptid a 2. vagy 4. szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciával 100%-os vagy kisebb aminosavszekvencia-azonossággal rendelkezhet. A következő leírás céljából, a szekvencia-azonosság azt jelenti, hogy ugyanolyan nukleotid vagy aminosav található az összehasonlított szekvencia vagy szekvenciák megfelelő helyzetében, mint ami az 1-4. szekvenciákban bemutatott szekvenciákban megtalálható. Egy polipeptid, mely 100%-nál kisebb szekvencia-azonossággal rendelkezik a 2. vagy 4. szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciához képest, különböző szubsztitúciókat tartalmazhat a természetben előforduló szekvenciából, ide értve a homológ és nem homológ aminosav-helyettesítéseket. A homológ aminosav-szubsztitúciók példáit lásd lentebb. Az azonos és a homológ gyökök számának összege osztva abban a szekvenciában lévő gyökök teljes számával, mely szekvenciában a korin polipeptidet összehasonlítjuk, egyenlő a százalékos szekvencia-hasonlósággal. A szekvencia-azonosság és hasonlóság kiszámolása céljából az összehasonlított szekvenciákat bármely kívánt módon, algoritmussal, számítógépes programmal, stb. illeszthetjük és számolhatjuk, ide értve a például a FASTA-t és a BLASTA-t. A 2. vagy 4. számú aminosav-szekvenciával kevesebb, mint 100% aminosavszekvencia-azonossággal rendelkező polipeptid például 99%-os, 98%-os, 97%-os, 95%-os, 90%-os, 70%-

os, stb. aminosavszekvencia-azonossággal rendelkezhet. Az aminosavszekvencia-azonosság mértéke előnyösen körülbelül 85% vagy több, például körülbelül 86%.

Egy emlős korin polipeptid, fragmentum, vagy szubsztituált polipeptid különböző módosításokat is tartalmazhat, ezek közé a módosítások közé tartozik a lipid módosítás, metiláció, foszforiláció, glikoziláció, kovalens módosítások (például egy aminosav R-csoportjának kovalens módosítása), aminosav-helyettesítés, aminosav-deléció, vagy aminosav-addíció. A polipeptid módosításait különböző módszerek szerint hajthatjuk végre, ezek közé tartoznak a rekombináns, szintetikus, kémiai módszerek, stb.

A találmány polipeptidjeit (például a humán korint vagy egér korint, ezek fragmentumait, ezek mutációit) különböző módokon használhatjuk fel, például mérőeljárásokban, immunogénként az antitestek mérésére, ahogy lentebb leírjuk, vagy biológialag aktív anyagokként (pl. melyek egy vagy több korinhoz kapcsolódó aktivitással rendelkeznek).

Egy korint kódoló polipeptidet, egy származékát vagy fragmentumát egy vagy több számunkra érdekes szerkezeti doménnel, funkcionális doménnel, detektálható doménnel, antigén doménnel és/vagy egy kívánt polipeptiddel kapcsolhatjuk össze olyan elrendezésben, mely a természetben nem fordul elő, például úgy, ahogy egy élő szervezetben, például egy humán vagy egér korin génben, vagy egy emlősből, mint például emberből vagy egérből, vagy ezek sejtvonalaiból készített genomi fragmentumban. Az ilyen jellemzőkkel rendelkező polipeptid egy kiméra vagy fúziós polipeptid. Egy ilyen kiméra polipeptid különböző módszerek sze-

rint állítható elő, ide tartoznak a kémiai, szintetikus, félszintetikus és/vagy rekombináns módszerek. Egy kiméra polipeptidet kódoló kiméra nukleinsav különböző doméneket vagy kívánt polipeptideket tartalmazhat egy folytonos (például több N-terminális doménnel az aktivitás fokozására vagy stabilizálására) vagy megszakított nyitott leolvasási keretben, például intronokat, splice helyeket, enhanszereket, stb. tartalmazva. A kiméra nukleinsav különböző módszerek szerint állítható elő. Lásd például az 5 439 819 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást. Egy domén vagy kívánt polipeptid valamely kívánt tulajdonsággal rendelkezhet, ide értve egy biológiai funkciót, mint például katalitikus, jelátviteli, növekedés elősegítő, sejtes célba juttató funkciót (például szignál szekvenciát, célzó szekvenciát, mint például az endoszómákba, lizoszómákba, endoplazmatikus retikulumba (ER), sejtmagba), stb., egy szerkezeti funkciót, mint például hidrofób, membránáthidaló, stb. funkciót, receptor-ligandum funkciókat és/vagy kimutatható funkciókat, például amikor egy enzimmel, fluoreszcens polipeptiddel, zöld fluoreszcens fehérjével [Chalfie et al., Science 263, 802 (1994); Cheng et al., Nature Biotechnology 14, 606 (1996); Levy et al., Nature Biotechnology 14, 610 (1996); stb. kapcsoljuk össze. Továbbá egy polipeptid, vagy annak egy része kimutatható markerként alkalmazható, amikor egy gazdasejtbe bevisszük. Például egy találmány szerinti aminosav-szekvenciát kódoló nukleinsav keretben fuzionálható egy kívánt kódoló szekvenciához, és toldalékként ("tag"-ként) működik a tisztításhoz, szelekcióhoz vagy jelzési célokra. A fúziós terület egy hasítási helyet kódolhat, hogy lehetővé váljon az

expresszió, izolálás, tisztítás, stb.

Egy találmány szerinti polipeptid a találmány szerint egy expressziós rendszerben, például *in vivo*, *in vitro*, sejtmentesen, rekombináns módon, sejtfúzióval, stb. állítható elő. A polipeptid módosításai olyan rendszerekkel hajtható végre, melyek közé a glikoziláció, aminosav-szubsztitúció (például eltérő kodon használat), polipeptid feldolgozás, mint például emésztés, hasítás, endopeptidáz vagy exopeptidáz aktivitás, kémiai részek - ide értve a lipideket és foszfátokat - kapcsolása, stb. tartoznak.

Egy találmány szerinti polipeptid természetes forrásokból, transzformált gazdasejtekből (tenyészközeg vagy sejtek) nyerhető ki szokásos módszerek szerint, ide tartozik a detergens extrakció (például Triton-X-100 CHAPS, oktilglükozid), ammónium-szulfátos vagy etanolos kicsapás, savas extrakció, anion- vagy kation-cserés kromatográfia, foszfocellulóz-kromatográfia, hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia, hidroxipapatit-kromatográfia és lektinkromatográfia. Szükség esetén fehérje újrarahajtogatási lépések alkalmazhatóak az érett fehérje konfigurációjának teljessé tételéhez. Végezetül nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (HPLC) alkalmazható a tisztítási lépésekhez. Egy korin polipeptid úgy is izolálható, ahogy más szerinproteázoknál leírták, például Wu et al., J. Biol. Chem. 267, 244-24412 (1992); Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci 88, 6775-6779 (1991).

Egy emlős korin nukleinsav vagy fragmense egy olyan nukleinsav, mely egy természetes forrásból nyerhető nukleotidszekvenciával rendelkezik. Lásd fentebb. Ezért magában

foglalja a természetben előforduló, normális, mutáns, polimorf alléleket, degenerált szekvenciákat, stb. Természetes források közé tartoznak például a szövetekből és teljes szervezetekből nyerhető élő sejtek, tenyésztett sejtvonalak, ide értve a primer és halhatatlanná tett sejtvonalakat. Előnyösen a következő, az Unigene adatbázisból [PubEST] származó nukleinsav-fragmentumok ki vannak zárva: Hs.62794 (AA126468 [168098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137], és AA046793 [1524691]), és Hs.71798 (AA147031 [1716421]). (A zárójelben lévő számok a PubEST adatbázis hivatkozási számai). Adott esetben a következő fragmentumokat szintén kizárhatjuk: Hs.121626 (AA771958), Hs.1657 (M69297) és Hs.4771 (AA203291), g1231787; g1312726; g1337948; és g942724. A fentebb említett nukleinsavak nukleotid-szekvenciáit a nyilvánosan hozzáférhető adatbázisokban történő kereséssel lehet azonosítani. Azonban azokat a nukleinsavakat, melyek magukban foglalják vagy tartalmazzák ezeket a szekvenciákat, nem zárjuk ki, például ilyen a teljes hosszúságú korin vagy egy ezek közül a fragmentumok közül kettőt vagy többet tartalmazó nukleinsav. Azt is előnyösnek tartjuk, ha egy klónozó vektorban, mint például egy plazmidban vagy fágban lévő fentebb említett fragmentumokat kizárjuk. A humán korin egy körülbelül 5 kb-os mRNS-ként expresszálódik. A legnagyobb mennyiségben a szívben van jelen. Az agyban, méhlepényben, tüdőben, májban, vázizomban, vesében, hasnyálmirigyben, lépben, csecsemőmirigyben, prosztatában, herében, petefészekben, vékonybélben, vastagbélben, húgyhólyagban és gyomorban nincs jelen, vagy nagyon kis mennyiségben expresszálódik. Következésképpen, a korin markerként használható a szívszövetek jelenlétének

kimutatására, például szövetmetszeteken (korin-specifikus antitesteket vagy korin-specifikus nukleinsav-próbákat alkalmazva), biopszia mintákban, stb. A korint különböző humán sejtvonalakban is kimutattuk, ezek közé tartozik az méhtumor, oszteoszarkóma, HEC-1-A, AN3 CA és RL95-2 méhnyálkahártya szarkóma, SK-LM-1 símaizomrost-szarkóma, U2-OS oszteoszarkóma. További részleteket írunk le lentebb a példákban.

A 4933 bázispáros humán korin allél nukleinsav-szekvenciáját az 1. szekvenciában mutatjuk be. A DNS mérete megfelel a Northern analízissel kimutatott korin mRNS (-5 kb) hosszának. Egy ATG kodon helyezkedik el a 95. helyzetben, mely egy transzlációs iníciációs helyet képviselhet. A nyitott leolvasási keret (ORF) 3126 bázispárt fog át, és egy 94 nukleotidos 5' nem lefordított régió (UTR) van az iníciációs kodon előtt. A 3' végnél egy 1,7 kb-os UTR található a stop kodon után a 3221. helyzetben. Egy AATAAA poliadenilációs szignál van jelen a poli(A) farok előtt. Egy találmány szerinti nukleinsav-szekvencia tartalmazhatja a teljes kódoló szekvenciát az 1. aminosavtól a 1042. aminosavig, ennek degenerált szekvenciáit és fragmenseit. Egy találmány szerinti nukleinsav szintén tartalmazhat egy olyan nukleotid-szekvenciát, mely 100%-ban komplementer, például a fentebb vagy későbbiekben említett bármely nukleotidszekvencia egy antiszensz szekvenciáját.

A találmány egy olyan egér nukleotidszekvenciára is vonatkozik, mely egy korin, például a 3. szekvenciában bemutatott korin egészét vagy részét kódolja. Mint a humán allél esetében, a találmány ennek degenerált szekvenciáira és antiszensz fragmentumaira is vonatkozik. A Northern analízis körülbelül 5 kb-nál egy

feltűnő transzkriptumot mutat a szívből származó mintákban. A humán mintákkal végzett Northern analízissel szemben, kis mennyiségű mRNS-t mutattunk ki az egér herékből és vesékből kapott mintákban. Egérben végzet *in situ* hibridizáció szintén korin mRNS-eket mutatott ki az embriogén szívszövetben, a pitvari és kamra izomsejtekben, fejlődő vesékben és a porc-eredetű szerkezetekben. További részleteket írunk le a példákban.

A találmány szerinti nukleinsavakat számos különböző forrásból nyerhetjük ki. Kinyerhetjük DNS-ből vagy RNS-ből, mint például poliadenilezett mRNS-ből, például melyet szövetekből, sejtekből vagy teljes szervezetből izoláltunk. A nukleinsavat közvetlenül DNS-ből vagy RNS-ből vagy egy cDNS könyvtárból kaphatjuk meg. A nukleinsav egy adott fejlődési állapotú, kívánt genotípusú, fenotípusú (például egy embrionális vagy felnőtt szívsejt vagy szövet), stb. sejtből állítható elő.

Ahogy a fentebb említett korin polipeptideknél leírtuk, egy találmány szerinti polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó nukleinsav magában foglalhatja csak a kódoló szekvenciát; egy kódoló szekvenciát és további kódoló szekvenciákat (például leader, szekretoros, célzó, enzimatis, fluoreszcens vagy más diagnosztikai peptidet kódoló szekvenciákat), kódoló szekvenciákat és nem kódoló szekvenciákat, például le nem fordított szekvenciákat az 5' vagy 3' végen, vagy szétszórva a kódoló szekvenciában, például intronokat. Egy polipeptidet megszakítás nélkül kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó nukleinsav azt jelenti, hogy a nukleotidszekvencia egy korin aminosav-kódolószekvenciát tartalmaz úgy, hogy a kódolószekvenciát nem szakítják meg, vagy nem ékelődnek közbe nem kódoló nukleotidok,

például az intronok hiányoznak. Egy emlős, humán vagy egér stb. korint kódoló genomi DNS-t szokásos módon kaphatunk meg.

Egy találmány szerinti nukleinsav egy expressziós szabályozó-szekvenciát is tartalmazhat, működőképesen összekapcsolva egy fentebb leírt nukleinsavval. Az "expressziós szabályozószekvencia" kifejezés egy olyan nukleinsav által kódolt polipeptid expresszióját szabályozó nukleinsav-szekvenciát jelent, melyhez működőképesen kapcsolódik. Az expresszió az mRNS vagy a polipeptid szintjén szabályozható. Tehát az expressziós szabályozószekvencia magában foglal mRNS-ek közé tartozó elemeket és fehérjék közé tartozó elemeket. Az ilyen elemek közé tartoznak a promóterek, enhanszerek (virális vagy sejtes), riboszómakötő szekvenciák, transzkripciós terminátorok, stb. Egy expressziós szabályozó szekvencia akkor kapcsolódik működőképesen egy nukleotid-kódolószekvenciához, ha az expressziós szabályozó szekvencia oly módon helyezkedik el, hogy a kódoló szekvencia expressziójára hatással van, vagy azt végrehajtja. Például amikor egy promóter működőképesen kapcsolódik a kódolószekvencia 5' végéhez, a kódolószekvencia expresszióját a promóter irányítja. A normális génhez képest az expressziós szabályozószekvenciák heterológok vagy endogének lehetnek.

Egy találmány szerinti nukleinsavat a nukleinsavhibridizáció alapján lehet szelektálni. Két egyszálú nukleinsavkészítmény hibridizálódási képessége lehetővé teszi a nukleotidszekvencia komplementaritás, például a nukleotidok, úgymint A-T, G-C stb. közötti bázispárosodás mérését. A találmány tehát azokra a nukleinsavakra is vonatkozik, melyek az 1. és 3. szekvenciában bemutatott nukleotidszekvenciát tartalmazó nukleinsavhoz hibridi-

záltnak. Egy utóbb említett szekvenciával hibridizáló nukleotidszekvencia egy komplementer nukleinsav-szállal fog rendelkezni, vagy templátként fog működni egy polimeráz (azaz egy megfelelő nukleinsav-szintetizáló enzim) jelenlétében. A találmány magában foglalja a nukleinsav mindkét szálát, azaz egy szensz és egy antiszensz szálát.

A hibridizációs körülményeket úgy lehet megválasztani, hogy azokat a nukleinsavakat válasszuk ki, melyek az 1. és 3. szekvenciában bemutatott nukleinsav-szekvenciához képest megfelelő nukleotid-komplementaritással rendelkeznek. Az ezekhez a szekvenciákhoz hibridizálni képes nukleinsav előnyösen körülbelül 85%-os, előnyösebben 90%-os, 92%-os, és még előnyösebben 95%-os, 97%-os vagy 100%-os szekvenciák közötti komplementaritással rendelkezik. A találmány különösen az olyan nukleotidszekvenciákra vonatkozik, melyek az 1. és 3. szekvenciában bemutatott nukleotidszekvenciával kevésbé vagy nagyon szigorú körülmények között hibridizálnak.

A korin szekvenciákhoz hibridizáló nukleinsavakat különböző módon szelektálhatjuk. Például a foltokat (azaz a nukleinsavat tartalmazó lenyomatokat) egy előhibridizációs oldatban (6X SSC, 0,5% SDS, 100 µg/ml denaturált lazac sperma DNS, 5X Denhardt oldat, és 50% formamid) inkubálhatjuk 30°C-on egy éjszakán át, majd radioaktívan jelölt próbákkal (korin) hibridizálhatjuk egy hibridizációs oldatban (6X SSC, 0,5% SDS, 100 µg/l denaturált lazac sperma DNS és 50% formamid), 42°C-on egy éjszakán át ismert eljárások szerint. A foltokat nagyon szigorú körülmények között moshatjuk, melyek például csak 5%-nál kevesebb hibás bázispárosodást (például kétszer mossuk 0,1% SSC és 0,1% SDS olda-

tában 30 percen át 65°C-on), azaz 95% vagy nagyobb szekvencia-azonosságot tesznek lehetővé. Míg a nagyon szigorú mosások kevesebb, mint 5% hibás bázispárosodást tesznek lehetővé, a gyengébb vagy kevésbé szigorú mosási körülmények (például mosás kétszer 0,2% SSC és 0,5% SDS oldatában 30 percen át 37°C-on) 20%-ig terjedő hibás bázispárosodást engednek meg. A kevésbé szigorú körülmények közé tartozik például, de nem kizárólag, egy 42°C-on történő utolsó mosás 30 mM NaCl-t és 0,5% SDS-t tartalmazó pufferben. A nagyon szigorú körülmények egy másik példája, a korlátozás szándéka nélkül, 65°C-on történő utolsó mosás 30 mM NaCl-t és 0,5% SDS-t tartalmazó vizes pufferoldatban. A mosást és a hibridizációt úgy is végrehajthatjuk, ahogy Sambrook és munkatársai leírták [Molecular Cloning 9. fejezet (1989)]. A hibridizáció a próba és a célszekvenciája között kialakult hibrid olvadási hőmérsékletének (T_m) kiszámolásán is alapulhat, ahogy azt Sambrook és munkatársai leírták. Az ilyen szigorú körülmények szelektálni képesek azokat a szekvenciákat, melyek például legalább 95%-os, előnyösen 97%-os nukleotid-komplementaritással rendelkeznek a nukleinsavak között, azzal a megkötéssel, hogy az ilyen szekvencia nem a Hs.62794 (AA126468 [168098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137], és AA046793 [1524691]), és Hs.71798 (AA147031 [1716421])). Lásd még fentebb és lentebb is. Azokat a nukleinsavakat, melyek magukban foglalják vagy tartalmazzák ezeket a szekvenciákat, nem zárjuk ki, például a teljes hosszúságú korint vagy egy ezek közül az említett fragmentumok közül kettővel vagy többel rendelkező nukleinsavat.

A találmány értelmében egy nukleinsav vagy polipeptid az 1-4.

szekvenciákban bemutatott nukleotid- és aminosav-szekvenciában egy vagy több eltérést tartalmazhat. A nukleotid- és/vagy aminosav-szekvencia cseréit vagy módosításait bármely hozzáférhető módszerrel végrehajthatjuk, ide tartozik az irányított vagy random mutagenézis.

A találmány szerinti humán vagy egér korint kódoló nukleinsav olyan nukleotidokat tartalmazhat, melyek a természetben előforduló korin génben található meg, például természetben előforduló polimorfizmusokat, normális vagy mutáns alléleket (nukleotid vagy aminosav), olyan mutációkat, melyeket az emlősök, mint például emberek, majmok, sertések, egerek, patkányok vagy nyulak természetes populációjában felfedeztek. A "természetben előforduló" kifejezés azt jelenti, hogy a nukleinsav egy természetes forrásból, például állati szövetből és sejtekből, testfolyadékokból, szövettenyészet sejtekből, törvényszéki mintákból nyerhető ki. A természetben előforduló mutációk közé tartozhatnak a nukleotidszekvencia deléciói (például egy csonkolt amino- vagy karboxi-terminális vég), szubsztitúciói vagy addíciói. Ezek a gének a szakterületen jártasak számára ismert eljárások szerint nukleinsav-hibridizációval mutathatók ki és izolálhatók. Egy találmány szerinti humán vagy egér korin polipeptidet kódoló nukleotidszekvencia egy természetben előforduló génben, transzkriptumban vagy cDNS-ben megtalálható kodonokat tartalmazhat, például amiket az 1. vagy 3. szekvenciában bemutatunk, vagy ugyanazt az aminosav-szekvenciákat kódoló degenerált kodonokat tartalmazhat. Például abból a célból lehet kívánatos a kodonok megváltoztatása a szekvenciában, hogy optimalizáljuk a szekvenciát egy kívánt gazdában történő expresszióhoz.

A találmány korin polipeptid muteinekre is vonatkozik, azaz bármely olyan polipeptidre, mely egy természetes forrásból nyerhető aminosav-szekvenciától aminosav-szekvenciájában különböző aminosav-szekvenciával rendelkezik (egy emlős korin fragmentuma aminosav-szekvenciájában nem különbözik egy természetben előforduló korintól). A korin muteinek aminosav-szubsztitúciókat, inszerciákat és deléciókat tartalmaznak, ide értve a természetben elő nem forduló aminosavakat is. A mutációk előállításához útmutatóként lásd például Wu és munkatársai művét [Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 7775-6779 (1991)], mely főként olyan aminosav-szubsztitúciókról számol be, ahol egy bázisos aminosavat glutaminsavval szubsztituáltak.

Egy találmány szerinti korin aminosav-szekvencia muteinjeit gén adatbankokból, például a Genbankból, EMBL-ből történő homológiakeresések alapján is előállíthatjuk. A szekvenciahomológia kereséseket különböző módszereket alkalmazva hajthatjuk végre, ide tartoznak a számítógépes programok BLAST családjában leírt algoritmusok, a Smith-Waterman algoritmus, stb.

Egy szekvenciába a mutein(ek) úgy vihetők be, hogy azonosítjuk és összeillesztjük egy olyan doménen belül az aminosavakat, melyek azonosak és/vagy homológok a polipeptidek között, és ezután az ilyen illesztések alapján módosítunk egy aminosavat. Például a humán korin és más fehérjék Frizzled, LDLR és szerinproteáz doménjei közötti szekvencia-összehasonlításokat a 2-4. ábrán mutatjuk be. Ezek az illesztések olyan aminosav-pozíciókat tárnak fel, melyek azonosak és olyan aminosav-pozíciókat is, ahol a gyökök különböznek egymástól, de homoló-

gok. A homológ aminosavakat az oldallánc mérete és a polarizáció mértéke alapján határozhatjuk meg, a nem poláros aminosavak közé tartozik: a cisztein, prolin, alanin, treonin; kis, poláros aminosavak közé: szerin, glicin, aszparaginsav, aszparagin; nagy, poláros aminosavak: glutaminsav, glutamin, lizin, arginin; köztes polaritású aminosavak: tirozin, hisztidin, triptofán; nagy, nem poláros aminosavak: fenilalanin, metionin, leucin, izoleucin, valin.

A homológ savakat a következőképpen is csoportosíthatjuk: töltés nélküli poláros R csoportok: glicin, szerin, treonin, cisztein, tirozin, aszparagin, glutamin; savas aminosavak (negatív töltésű): aszparaginsav és glutaminsav; bázisos aminosavak (pozitív töltésű): lizin, arginin, hisztidin. A homológ aminosavak magukban foglalják azokat is, melyeket Dayhoff leírt az Atlas of Protein Sequence and Structure 5 című művében (1978), és melyeket Argos írt le [EMBO J. 8, 779-785 (1989)].

A találmány szerinti muteinek az olyan aminosav-szekvenciákat foglalják magukban, melyekben a humán vagy egér korinszekvenciában egy gyök egy megfelelő doménból származó homológ gyökkel van helyettesítve.

Tehát a találmány egy olyan 2. vagy 4. szekvencia szerinti korin nukleotidszekvenciára vonatkozik, melyben egy vagy több aminosavpozíció szubsztituált vagy deletált, vagy mindkettő, és a nukleinsav által kódolt polipeptid szerinproteáz katalitikus domén aktivitással vagy egy korinra specifikus immunogén aktivitással rendelkezik. Az ilyen nukleinsav tartalmazhat egy vagy több szubsztituált aminosavpozíciót, mely homológ aminosavakkal szubsztituált.

Továbbá a szekvenciaillesztések, ahogy a 2-4. ábrán szemléltetjük, információt nyújtanak azokról az aminosavszubsztitúciókról, melyekkel kapcsolatban azt várnánk, hogy azok csökkentenek vagy megszüntetnek egy biológiai aktivitást. Például ahol az illesztés két vagy több domén között konzerválódott azonos aminosavakat tár fel (például a 4. ábrán jelzett konzervatív H, D; vagy S gyökök helyettesítésével), az aminosav(ak) eliminációja vagy szubsztitúciója a biológiai aktivitásra hatással lehet majd. A katalitikus triádban nevezetesen a His910-ben, Asp959-ben és Ser1052-ben (egér korin) lévő mutációk megszüntetik a szerinproteázok katalitikus aktivitását.

Egy korin polipeptid mutein és a neki megfelelő nukleotid kódolószekvencia a 2. vagy 4. szekvenciában bemutatott aminosavszekvenciával rendelkezhet, kivéve, ahol egy vagy több helyzet homológ aminosavakkal szubsztituált, például ahol 1, 5, 10, 15 vagy 20 szubsztitúció van jelen. A találmány a mutein polipeptidekre és az ilyen polipeptideket kódoló mutein nukleinsavakra is vonatkozik.

Egy találmány szerinti nukleinsav tartalmazhat például DNS-t, RNS-t, szintetikus nukleinsavat, peptid nukleinsavat, módosított nukleotidokat, vagy keverékeket. Egy DNS kétszálú vagy egyszálú lehet. Egy nukleinsavban lévő nukleotidok különböző ismert kötéssel keresztül kapcsolódhatnak, például észter, szulfamát, szulfamid, foszforotioát, foszforamidát, metilfoszfonát, karbamát, stb. kötéssel, a kívánt céltól függően, például nukleázokkal, mint például RNáz-H-val szembeni rezisztencia, javított *in vivo* stabilitás, stb. érdekében. Lásd például az 5 378 825 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást.

Különböző módosításokat hajthatunk végre a nukleinsavakon, mint például kimutatható markerek (avidin, biotin, radioaktív elemek), hibridizációt, kimutatást vagy stabilitást javító részeket kapcsolhatunk hozzá. A nukleinsavakat szilárd hordozókhoz is kapcsolhatjuk, például nitrocellulózhoz, mágneses vagy paramágneses mikrogömbökhöz (például ahogy az 5 411 863 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és az 5 543 289 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírták, melyek például ferromágneses, szupermágneses, paramágneses, szupermágneses, vas-oxid és poliszacharid mikrogömböket tartalmaznak), nejlonhoz, agarózhoz, diazotált cellulózhoz, latex szilárd mikrogömbökhöz, poliakrilamidokhoz, stb., egy kívánt módszer szerint. Lásd például az 5 470 967, 5 476 925 és 5 478 893 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást.

A találmány egy másik tárgya oligonukleotidokra és nukleinsav-próbákra vonatkozik. Ilyen oligonukleotidok vagy nukleinsav-próbák alkalmazhatók például egy emlős korin nukleinsav kimutatására, mennyiségi meghatározására vagy izolálására egy teszt-mintában. Egy előnyös megvalósítási módban, a nukleinsavak oligonukleotid-próbákként alkalmazhatók, például PCR-ban, RACE-ben, differenciális bemutatásban cDNS könyvtárakkal, expressziós könyvtárakkal, stb. együtt. Felhasználható oligonukleotidokat írunk le lentebb a példákban. A kimutatás egy sor különböző célból lehet kívánatos, ide tartozik a kutatás, diagnosztika és törvényszéki vizsgálat. Kimutatási célokból egy ilyen nukleinsav-szekvencia jelenlétének vagy minőségének megállapítása lehet kívánatos egy mintában, ahol a mintát szövetből, sejtekből,

testfolyadékokból, stb. nyertük ki. Egy előnyös módszerben a találmány egy nukleinsav kimutatási eljárásra vonatkozik, és a következőket tartalmazza: egy tesztmintában lévő cél-nukleinsavat egy oligonukleotiddal hozzuk érintkezésbe olyan körülmények között, mely hatásos a célszekvencia és az oligonukleotid közötti hibridizáció elérése szempontjából, és a hibridizációt kimutatjuk. Egy találmány szerinti oligonukleotidot szintetikus nukleinsav-amplifikációban is alkalmazhatjuk, mint például PCR-ban [például Saiki et al., Science 241, 53 (1988); 4 683 202 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; PCR protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (szerk.) Academic Press, New York (1990)], vagy differenciális bemutatásban [például Liang et al., Nucl. Acid. Res. 21, 3269-3275 (1993); 5 599 672 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; WO 97/18454 számú nemzetközi közzétételi irat] vagy RACE. Az ilyen kimutatást más gének, például a szívszövet vagy csont fejlődésében vagy működésében résztvevő gének oligonukleotidjaival együtt hajthatjuk végre.

A találmány egy másik tárgya egy olyan nukleotidszekvencia, mely egyedi a humán korinra vagy az egér korinra nézve. A korinra nézve egyedi szekvencia a nukleotidok meghatározott sorrendjét jelenti, mely a korinban, például az 1. vagy 3. szekvencia nukleotidszekvenciájában fordul elő, viszont ritkán vagy nem gyakran fordul elő más nukleinsavakban, különösen nem állati nukleinsavban, előnyösen emlősben, úgymint emberben, patkányban, egérben, stb. Ide tartoznak a szensz és az antiszensz nukleotidszekvenciák is. Egy találmány szerinti egyedi nukleinsavat szokásos módon határozhatunk meg. Egy ilyen egyedi szek-

venciát tartalmazó nukleinsavat hibridizációs próbaként alkalmazhatjuk például egy humán vagy egér korin jelenlétének meghatározására egy nukleinsavak elegyét tartalmazó mintában, például egy Northern blotban. A hibridizációt szigorú körülmények között (lásd fentebb) hajthatjuk végre, hogy a legalább 95%-ban azonos (azaz komplementer) nukleinsavakat válasszuk ki, de kevésbé szigorú körülményeket is alkalmazhatunk. Egy egyedi korin nukleotidszekvenciát az 5' vagy 3' végénél keretben különböző, a szabadalmi leírás során említett nukleotidszekvenciákhoz fuzionálhatjuk, ide tartoznak a korin más részeit, enzimeket, GFP-t stb., expressziós szabályozó szekvenciákat stb. kódoló szekvenciák.

A hibridizációt különböző körülmények között hajthatjuk végre, a kívánt szelektivitástól függően, például ahogy Sambrook és munkatársai leírták [Molecular Cloning (1989)]. Például a humán vagy egér korin specifikus kimutatásához egy oligonukleotidot egy célnukleinsavhoz olyan körülmények között hibridizálhatunk, melyben az oligonukleotid például csak akkor hibridizál, ha az oligonukleotid 100%-ban komplementer a célszekvenciával. Különböző körülményeket alkalmazhatunk, ha az a kívánatos, hogy olyan nukleinsavakat válasszunk ki, melyek kevesebb, mint 100% nukleotid-komplementaritással rendelkeznek, legalább körülbelül 99%, 97%, 95%, 90%, 70%, 67% komplementaritással.

A találmány szerinti oligonukleotidok tartalmazhatják az 1. vagy 3. szekvencia valamely összefüggő nukleotidszekvenciáját. Ezek a találmány szerinti oligonukleotidok bármilyen kívánt méretűek lehetnek, például körülbelül 10-200 nukleotidosak, 12-100 nukleotidosak, előnyösen 12-50, 12-25, 14-16, legalább körülbe-

lül 15, legalább körülbelül 20, stb. nukleotidosak. Az oligonukleotidok természetben elő nem forduló nukleotidokkal is rendelkezhetnek, például inozinnal. Az oligonukleotidok 100%-ban azonosak vagy komplementerek lehetnek egy 1. vagy 3. szekvencia szerinti szekvenciával, vagy hibás bázispárosodások vagy nukleotidszubsztitúciók, például 1, 2, 3, 4 vagy 5 szubsztitúció lehet bennük. A találmány értelmében az oligonukleotidot egy készlet tartalmazhatja, ahol a készlet magában foglal egy kívánt puffert (például foszfát-, tris- stb. puffert), kimutatási készítményeket, stb. Az oligonukleotid a szakterületen ismert radioaktív vagy nem radioaktív jelekkel jelölt vagy jelöletlen lehet.

Egy találmány szerinti nukleinsavból antiszensz nukleinsavat is lehet készíteni, ez előnyösen az 1. vagy 3. szekvencia kódoló szekvenciájának antiszensz szekvenciája. Az antiszensz nukleinsavat különböző módokon használhatjuk fel, mint például a korin expressziójának szabályozására vagy módosítására, például gátlására, expressziójának kimutatására vagy *in situ* hibridizálásra. Ezeket az oligonukleotidokat az 5 576 208 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírással analóg módon alkalmazhatjuk. A korin expressziójának szabályozása vagy módosítása céljából egy antiszensz oligonukleotidot működőképesen kapcsolhatunk egy expressziós szabályozó szekvenciához.

A találmány szerinti nukleinsavat bármely kívánt módszer szerint jelölhetjük. A nukleinsavat radioaktív nyomjelzőket, mint például ^{32}P -t, ^{35}S -t, ^{125}I -t, ^3H -t vagy ^{14}C -t alkalmazva jelölhetjük meg, hogy néhány általánosan alkalmazott nyomjelzőt említünk. A radioaktív jelölést bármely módszer szerint végrehajt-

hatjuk, mint például a 3' vagy 5' vég terminális jelölésével egy radioaktívan jelölt nukleotidot alkalmazva, polinukleotid kinázzal (egy foszfátázzal végzett defoszforilezéssel) vagy egy ligázzal (a jelölendő végtől függően). Egy nem radioaktív jelölést is alkalmazhatunk, egy találmány szerinti nukleinsavhoz olyan gyököket kapcsolva, melyek immunológiai tulajdonságokkal (antigének, haptének), az adott reagensekkel szemben specifikus aktivitással (ligandumok) vagy olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek lehetővé teszik, hogy kimutatható enzimreakciók menjenek végbe (enzimek vagy koenzimek, enzimszubsztrátok vagy más olyan anyagok, melyek egy enzimatis reakcióban részt vesznek), vagy jellemző fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például fluoreszcencia vagy fényemisszió vagy abszorpció egy kívánt hullámhosszon, stb.

Egy találmány szerinti nukleinsavat, ide értve az oligonukleotidokat, antiszensz nukleinsavat stb., a korin expressziójának kimutatására használhatjuk fel teljes szervezetben, szövetekben, sejtekben, stb., különböző módszerekkel, ide tartozik a Northern blot, PCR, RACE, *in situ* hibridizáció, stb. Az ilyen nukleinsavak különösen hasznosak a korin megzavart expressziójának, például a sejtspecifikus és/vagy szubcelluláris megváltozásának kimutatására. A korin mennyiségét meghatározhatjuk önmagában vagy más géntermékekkel, különösen szívspecifikus géntermékekkel együtt.

Egy találmány szerinti nukleinsavat egy sor, különböző rendszerben expresszálhatjuk *in vitro* és *in vivo*, a kívánt cél szerint. Például egy nukleinsav egy expressziós vektorba inszertálható, egy kívánt gazdába vihető be, és a nukleinsav ál-

tal kódolt polipeptid expressziójának elérése szempontjából hatásos körülmények között tenyésztethető. A hatásos körülmény bármely olyan körülményt magában foglal, mely a polipeptid termelésének egy gazdasejttel történő végrehajtására alkalmas, ide értve a hatásos hőmérsékleteket, pH-t, tápközegeket, azoknak a tápközegeknek az adalékait, melyekben a gazdasejtet tenyésztjük (például olyan adalékokat, melyek megsokszorozzák vagy kiváltják az expressziót, mint például vajsav vagy metotrexát, ha a kódoló nukleinsav egy dhfr génnel szomszédos), cikloheximid, sejtsűrűségek, tenyésztőedények, stb. Egy nukleinsavat a sejtbe bármely hatásos módszerrel bevihetünk, ide tartozik például a csupasz DNS, kalcium-foszfát precipitáció, elektroporáció, injekció, DEAE-dextrán közvetített transzfekció, liposzómás fúzió, olyan ágensekkel végzett összekapcsolás, mely fokozza a sejtekbe való felvételét, vírusfertőzés. Egy sejt, melybe a találmány szerinti nukleinsavat bevisszük, a transzformált gazdasejt. A nukleinsav extrakromoszómális lehet, vagy a gazdasejt kromoszómájába vagy kromoszómáiba integrálódhat. Stabil vagy átmeneti lehet. Egy expressziós vektort a gazdasejttel való kompatibilitása alapján választunk ki. A gazdasejtek közé tartoznak az emlős sejtek, például COS-7, CV-1, BHK, CHO, HeLa, LTK, NIH 3T3, élesztő, rovarsejtek, mint például Sf9 (*S. frugipeda*) és *Drosophila*, baktériumok, mint például *E. coli*, *Streptococcus*, *Bacillus*, élesztő, gombasejtek, növénysejtek, embrionális őssejtek (például emlős, mint például egér vagy humán), csontsejtek (mint például oszteoklasztok vagy kondrociták), szívsejtek (például primer tenyészetekből), izomsejtek, idegsejtek, stb. Az expressziós szabályozó szekvenciákat hasonló módon a gazdakompatibilitás és a

kívánt cél alapján választjuk ki, ilyen például a nagy példányszám, a nagy mennyiségek, az indukció, az amplifikáció, a szabályozott expresszió. Más alkalmazható szekvenciák közé tartoznak az enhanszerek, mint például az SV40-ből, CMV-ből, RSV-ből származó enhanszerek, az indukálható promóterek, sejttípus-specifikus elemek vagy a szelektív vagy specifikus sejtexpressziót lehetővé tévő szekvenciákat. Az expresszió irányítására alkalmazható promóterek közé tartozik például az endogén promóter, MMTV, SV4; trp, lac, tac, vagy T7 promóter a bakteriális gazdákhoz; vagy alfa faktor, alkohol oxidáz vagy PGH promóter az élesztőhöz.

Egy másik számunkra fontos gént is bevihetünk ugyanabba a sejtbe például a korinfunkció módosítása céljából. Az ilyen gének normális gének lehetnek, vagy lehet egy változat, egy mutáció, kiméra, polimorfizmus stb.

A találmány szerinti nukleinsav vagy polipeptid méretmarkerként alkalmazható nukleinsav- vagy fehérje-elektroforézisben, kromatográfiában, stb. Meghatározott restriktációs fragmentumokat azonosíthatunk a restriktációs helyek szekvenciájának szkennelésével, a méret kiszámításával, és a megfelelő restriktációs emésztés végrehajtásával. Egy 1. szekvenciában bemutatott korin cDNS-t egy 4,8 kb-os molekulamarkerként alkalmazhatjuk a nukleinsav-elektroforézisben.

Az 1. szekvenciában bemutatott humán korin cDNS a 4p12-13 humán kromoszómapozícióra térképeződik.

Így a családfa-térképezésben markerként alkalmazható. Például úgy tűnik, hogy ez a kromoszómarégió a teljes anomáliás tüdővéna-visszahajlással (TAPVR) együtt szegregálódik, és ezért más

genetikai markerekkel együtt a betegség térképezésére alkalmazható. Lásd például Bleyl és munkatársai művét [Am. J. Hum. Genet. 56, 408-415 (1995)].

A találmány egy másik tárgya azoknak a biológiai útvonalaknak a szabályozására vonatkozik, melyekben egy korin gén vagy géntermék részt vesz, különösen ilyen a patológiás és fejlődési körülmények szabályozása, és az ilyen állapotok diagnosztizálására vonatkozik a korin polipeptid vagy nukleinsav kimutatásával. Például az ANF különböző szív- és érrendszerrel és vesével kapcsolatos fiziológiai folyamatokban vesz részt, ide értve például a testfolyadék homeosztázist, vérnyomást, értágulást, nátriurézist, a nátrium-abszorpció gátlását a glomerulális érben, megnövekedett glomeruláris filtrációt, az aldoszteron termelés és szekréció gátlását, mitogenezist stb. A korin pro-ANF aktivitásának szabályozása tehát erős hatásokkal rendelkezik egy szervezet fiziológiájára. Például az ANF szívkamrai mennyisége normálisan kicsi a szívkamra izomsejtekben, de a szív- és érrendszeri betegségekkel drámaian megnő. A szívszélhúdéses betegekben az ANF plazmaszintjei magasak. A nagy koncentrációk korrelációban állnak a kamradiszfunkció súlyosságával. Hasonló módon az ANF koncentrációi kapcsolatban állnak a szívritmuszavarokkal és a hemodinamikai problémákkal. Lásd például Levin és munkatársai művét [New Engl. J. Med. 339, 321-328 (1998)]. Az abnormálisan magas szintek a korin aktivitásának csökkentésével gátolhatók, például transzkripcionálisan, a génexpresszió gátlásával, vagy enziminhibítorok beadásával, melyek közvetlenül hatnak a katalitikus aktivitásra.

Mivel a korin a porc-eredetű és porcsejtekben nagy mértékben

expresszálódik, lehetséges, hogy részt vesz az ezekkel a szöve-
tekkel kapcsolatos betegségekben, mint például a családi hipert-
rófiás kardiomiopátiában, oszteopetrózisban és oszteoporózis-
pszeudoglióma szindrómában, oszteoporózisban, Paget betegségben,
oszteitisz deformans-ban és a teljes anomáliás tüdővéna-
visszahajlásban. Ahogy említettük, a korin oligonukleotidokat a
családfa-térképezésekben alkalmazhatjuk ezeknek a betegségeknek
a családi öröklődésének a tanulmányozására, a TAPVR-rel analóg
módon, és diagnosztikai célokra (például prenatális célokra), ha
a korin egy ilyen betegséggel kapcsolatos (génkapcsoltság vagy
okozás). A korin részt vehet a szív kialakulásában, a fejlődési
útvonalakban, melyek magukban foglalják a Wnt fehérjékkel és más
növekedési faktorokkal történő jelátvitelt, a sejtdifferenciáló-
dást (például porcsejt-differenciálódásban) és ezzel kapcsolatos
folyamatokat. Továbbá a korin részt vehet a sejt-sejt jelátvi-
telben, differenciálódásban (csont és/vagy porc) és egyéb fejlő-
dési útvonalakban. Ezt a szerepet a szerinproteáz katalitikus
aktivitás, a frizzled domének és/vagy az LDRL domének közvetít-
hetik. A korin részt vehet a növekedési faktorok, mint például a
BMP vagy TGF- β feldolgozásában (például az elő-növekedési faktor
katalitikus hasításával).

Ugyanezek az irányvonalakon haladva a találmány egy további
tárgya a szív- és érrendszeri és vesebetegségek, úgymint a magas
vérnyomás, a szívszélhúdás, vagy a veseelégtelenség (valamint
bármely olyan reakcióút, melyben a korin részt vesz) kezelésére
vonatkozik, mely egy emlős korin aktivitását módosító szer hatá-
sos mennyiségének beadását tartalmazza egy olyan betegnek, aki-
nek erre szüksége van. A „módosít” kifejezés a következőket je-

lenti: növeli, serkenti, elősegíti, stabilizálja, csökkenti, redukálja, antagonizálja, blokkolja, gátolja stb. A kívánt módosító hatást szokásos módon határozhatjuk meg, például, hogy vajon a patológiai hatást az ANF megnövekedett vagy csökkent mennyiségei hozzák-e létre. Az aktivitás egy olyan szer beadásával gátolható, mely közvetlenül blokkolja a korin katalitikus aktivitását (például egy enziminhibítor, mint például a leupeptin vagy a diizopropil-fluorfoszfát), vagy egy szerrel, mint például antiszensz nukleinsavval, mely gátolja a megfelelő gén transzkripcióját vagy transzlációját. A korin aktivitást megnövelhetjük például egy olyan korin génnel, mely képes a korin polipeptid előállítására. A korin gén más génterápiákkal analóg módon adható be. Lásd például Magovern és munkatársai művét [Hum. Gen. Ther. 8, 215-227 (1997); Springer és munkatársai művét [Mol. Cell. 2, 549-558 (1998)].

A találmány a korin aktivitásának módosítási eljárásaira is vonatkozik bármilyen környezetben, ide tartoznak az *in vitro* és *in vivo* eljárások, az aktivitás közvetlen módosítása által vagy az azt kódoló gén expressziójának módosításával. Az enzimaktivitást hagyományos módon mérhetjük, például ahogy Wu és munkatársai leírták [J. Biol. Chem., 267, 24408-24412 (1992); Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 6775-6779 (1991)]. A konvertáló aktivitást úgy mérhetjük, ahogy a példákban leírjuk, vagy például ahogy Inagami leírta [J. Biol. Chem. 264, 3043-3046 (1989)]. A találmány tehát egy korin polipeptid, fragmentum vagy mutein fentebb említett aktivitása modulátorainak azonosítási eljárására vonatkozik, mely során egy tesztvegyület jelenlétében egy korin polipeptidet, egy fragmentumát és a szerinproteáz vagy átalakító

enzim egy szubsztrátját reagáltatjuk olyan hatásos körülmények mellett, melyben az említett polipeptid vagy fragmentuma az említett szubsztrátot hasítja; kimutatjuk az említett hasítást; és úgy azonosítjuk, hogy vajon a tesztvegyület módosítja-e a szerinproteáz aktivitást, hogy összehasonlítsuk a vegyület jelenlétében és anélkül kapott hasítás mértékét.

Bármilyen szubsztrát megfelel, és a kimutatás bármely módszerre, így például kromogén, fluorogén, radioaktív, elektroforetikus stb. kimutatás alkalmazható. Például a hasítás termékeit jelölt szubsztrátokat alkalmazva mutathatjuk ki gélelektroforézissel. Egy előnyös példában a szubsztrát egy kromogén szubsztrát, azaz egy olyan peptid, mely a szerinproteázzal reagál, és melyet úgy tervezünk meg, hogy az enzim természetes szubsztrátjához hasonló szelektivitással rendelkezzen. A peptidrészhez kapcsolt kromogén szubsztrát egy olyan kémiai csoport, mely amikor az enzimes hasítás után felszabadul, egy kimutatható színt okoz. A színváltozás spektrofotometrikusan nyomon követhető, és arányban áll a szerinproteáz katalitikus domén proteolitikus aktivitással. Ezeket a szubsztrátokat szokásos módon szintetizálhatjuk meg. A szubsztrát hidrolízisét (például mely kromofórként 4-nitroanilint, pNA-t tartalmaz) szobahőmérsékleten mérhetjük az abszorbancia 405 nm-en történő nyomon követésével. A szerinproteáz amidolitikus aktivitásának mérésére használható szubsztrátok közé tartozik az S2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA.2HCl), S2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA.HCl) illetőleg az S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA.2HCl). Egyéb szubsztrátba építhető kromofórok közé tartozik például az ANBA, ADMP, tioészter származékok, stb. További

információk céljából lásd például a Chromogenix katalógusokat és honlapjait. A K_m és k_{cat} értékek a Michaelis-Menton egyenlettel számíthatók ki.

A találmány azoknak a vegyületeknek az azonosítási eljárására is vonatkozik, melyek specifikusan kötődnek egy korin polipeptidhez, mely eljárás során egy korin polipeptidet egy tesztvegyülettel hozzuk érintkezésbe olyan hatásos körülmények között, melyben a tesztvegyület specifikusan kötődik az említett korin polipeptidhez; és kimutatjuk az említett korin polipeptid kötődését. A kötési mérőeljárásokat hagyományos módon hajthatjuk végre. A korin polipeptid tartalmazhatja a teljes kódolószekvenciát, vagy annak fragmentumait, különösen egy vagy több LDLR domént, frizzled domént, SRCR-t vagy ezek kombinációját. Az ilyen domének aminosav-pozícióit lásd fentebb. A domének fúziós fehérjékként használhatóak fel, például immunglobulin doménekkel együtt. Lásd például az 5 639 597 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást.

A korin komponens a reakcióelegyhez különböző formában adható hozzá, például lényegében tisztított formában, egy sejt komponenseként, szolubilis extraktumként vagy lizátumként. Mindegyik esetben a korin polipeptidet egy természetes forrásból, egy rekombináns forrásból kaphatjuk meg (azaz egy rekombináns polipeptidet géntechnológiával állítunk elő, például egy plazmidon, csupasz DNS-ként, stb., egy sejtvonalba visszük be, és a sejtben kifejezzük), vagy szintetikusan állíthatjuk elő (vegyi úton vagy enzimatikusan előállítva, például egy teljes hosszúságú korinnak a 801. aminosavánál végzett hasításával, például egy 802-1042. fragmens alkalmazásakor). A korin

polipeptidet egy emlős sejtben, egy rovar sejtvonalba vagy baktériumokban fejezhetjük ki fúziós vagy nem-fúziós fehérjeként.

Előnyösen a korin egy korin kódolószekvenciával (például egy cDNS-sel, egy génnel, egy genomi fragmentummal stb.) transzformált sejtvonalba fejeződik ki. Utóbbi esetben a korin a sejt heterológ komponenseként van jelen; a heterológ azt jelenti, hogy a korint egy olyan kódoló szekvencia kódolja, mely emberi beavatkozással van bejuttatva a sejtbe, például transzfekcióval, transzformációval stb. Előnyösen a korin nagy mennyiségben fejeződik ki a sejtben (bakteriális, élesztő, rovar, emlős sejt stb.). Kódoló szekvenciaként egy humán korint részesítünk előnyben. Lásd például az 1. és 2. szekvenciát.

A találmány egy előnyös megvalósulásában a korint sejtlizátumként biztosítjuk, például a humán korinnal transzformált sejteket lizáljuk, és a kapott lizátumot közvetlenül használjuk fel a mérőeljárásban, azaz nyers lizátumként. A rekombináns humán korint tartalmazó nyers lizátum adott esetben finomítható vagy a humán korinra feldúsítható. Például hagyományos úton membránfrakciókat izolálhatunk.

A korin az expressziós útvonalának korábbi lépéseiben is módosítható, például a transzkripciójának, mRNS stabilitásának, transzlációjának, transzláció utáni modifikációinak, feldolgozásának (mint például vágás egy belső hasítási helyen) stb. módosításával. Az expresszió különböző anyagokat, például antiszensz nukleinsavat, egy ribozimot, egy aptamert, egy szintetikus vegyületet vagy egy természetben előforduló vegyületet alkalmazva szabályozható.

Az ilyen és más módokon azonosított vegyületek a

korinaktivitás módosítására használhatóak fel egy sejtben, egy szövetben, egy teljes szervezetben *in situ*, *in vitro* (tesztcső, szilárd hordozó stb.), *in vivo*, vagy bármely kívánt környezetben. Általánosságban, egy ilyen *in vitro* aktivitással rendelkező vegyület felhasználható lesz majd egy korinhoz kapcsolódó biológiai útvonal módosítására, például a fentebb említett biológiai és sejtes aktivitásokkal kapcsolatos patológiás állapotok kezelésére, ezek közé tartoznak a csont- és szívbetegségek és ezek fejlődési rendellenességei, a szerinproteáz aktivitáson keresztüli növekedési faktor és fehérje érés módosítására, stb.

Egy betegség kezelésére a vegyület vagy elegyet egy gyógyszerati készítménybe formulázhatjuk, mely egy gyógyszeratilag elfogadható hordozót és más, a szakemberek számára nyilvánvaló hordozóanyagot tartalmaz. Lásd például a Remington's Pharmaceutical Sciences-t , 18. Kiadás, Mack Publishing Company (1990). Az ilyen készítmények továbbá más vegyületek hatásos mennyiségét tartalmazhatják.

A találmány egy emlős korint kódoló gén expressziójának módosítási, előnyösen gátlási eljárására is vonatkozik, mely során egy találmány szerinti emlős korint, mint például egy humán vagy egér korint expresszázó sejtet érintkezésbe hozunk egy ágens, mint például egy humán vagy egér korin gén atiszensz oligonukleotidjának vagy antiszensz RNS-ének egy olyan mennyiségével, mely képes szekvenciaspecifikusan gátolni az említett gént. Egy korin gén expressziójának gátlása képes megakadályozni az ANF érését, és ebből eredően hatással van azokra a reakcióutakra, melyben az ANF részt vesz, ide értve a fentebb említetteket.

Egy gén szekvenciaspecifikus gátlását hagyományosan antiszensz nukleinsavat, mint például antiszensz oligonukleotidokat vagy RNS-t alkalmazva lehet végrehajtani. Például antiszensz oligonukleotidok, mint például foszfodiészter- vagy foszforotioát-dezoxioligonukleotidok tervezhetők egy korin RNS specifikus régióihoz, mint például a transzlációs iníciációs helyhez, és az ilyen géneket expresszáló sejtekhez adható olyan mennyiségben, mely gátolja az expressziójukat. Általánosságban, az antiszensz nukleinsav egy olyan nukleinsav, mely komplementer egy adott gén szensz vagy kódoló szálával, és ennek eredményeképp komplementer, és így képes specifikusan hibridizálni a gén mRNS transzkriptumaival.

A stabilitás fokozására a beadott nukleinsav módosítható, például rezisztenssé tehető a celluláris enzimekkel, oxidációval, redukcióval, nukleázokkal, stb. szemben, vagy sejtbe való felvételük fokozható. Bármilyen alkalmas módosítást használhatunk, ide tartoznak például a foszforotioátok, metilfoszfonátok, egy akridin interkaláló szerhez és/vagy hidrofób farokhoz kapcsolt foszfodiészter-oligonukleotid, pszoralén származékok, 2'-ribóz módosítások; pentóz cukorszármazékok; nitrogénbázis-származékok, stb. Lásd például az 5 576 208 számú és az 5 744 362 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást. Az egyéb találmányban alkalmazható származékokat és módosulatokat lásd fentebb. Általánosságban egy találmány szerinti antiszensz nukleinsav természetben előforduló nukleotidokat, természetben nem előforduló nukleotidok monomerjeit és ezek kombinációit tartalmazhatja a sejt felvétel és/vagy stabilitás fokozására.

Az antiszensz nukleinsav csupasz nukleinsavként, más olyan

szerekkel komplexbe vitt vagy kapszulázott formában adható be, mely lehetővé teszi egy sejtbe való felvételét, a sejtekbe injektálható, vagy valamilyen alkalmas vektorral, mint például virális vagy adenovektorral kapcsolatos beviteli módszerrel juttatható be. Az antiszensz génterápia bármely alkalmas módszerrel megvalósítható. Lásd például: Phillips, Am. J. Cardiol. 82, 605-625 (1998); Haller et al., Kidney Int. 53, 1550-1558 (1998).

A találmány azokra az antitestekre is vonatkozik, melyek specifikusan felismerik a korint. Egy korinra specifikus antitest azt jelenti, hogy az antitest egy korinban lévő vagy azt magában foglaló aminosavak egy meghatározott szekvenciáját, például a 2. és 3. szekvencia humán és egér szekvenciáit felismeri. Tehát egy specifikus antitest általában nagyobb affinitással fog kötődni egy 2. szekvenciában megtalálható aminosav-szekvenciához, azaz egy epitophoz, mint egy eltérő epitophoz vagy epitopokhoz, ahogy azt például egy immunfolt vizsgálattal vagy más hagyományos immunoassay-vel kimutatjuk és/vagy mérjük. Tehát a humán korin egy epitopjára specifikus antitest felhasználható az epitop jelenlétének kimutatására egy mintában, például a humán korin génterméket tartalmazó szövetmintában, mely megkülönbözteti azt azoktól a mintáktól, melyekből az epitop hiányzik. Az ilyen antitestek úgy használhatók fel, ahogy azt a Santa Cruz Biotechnology Inc. Kutatási Termékkatalógusában leírták, és hagyományos módon formulázható, például 100 µg/ml-mennyiségben. Az antitesteket, például poliklonális, monoklonális, rekombináns, kiméra, humanizált antitesteket bármilyen kívánt módon elő állíthatjuk. Lásd még a rekombináns immunglobulin könyvtárak szkrínelését is [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci 86, 3833-

3837 (1989); Huse et al., Science 256, 1275-1281 (1989)] és a limfocita populációk *in vitro* stimulálását [Winter és Milstein, Nature 349, 293-299 (1991)]. Például a monoklonális antitestek termelése céljából egy 2. vagy 3. ábra szerinti polipeptidet adhatunk be az egereknek, kecskéknek vagy nyulaknak szubkután módon és/vagy intraperitoneálisan; adjuvánssal vagy adjuváns nélkül, olyan mennyiségben, mely képes immunválaszt kiváltani. Az antitestek egyláncúak, vagy FAb fragmensek is lehetnek. Az antitest lehet IgG, IgG2a, IgG1 stb. szubtípus. Az antitestek és az immunválaszok csupasz DNS beadásával is létrehozhatók. Lásd például az 5 703 055, 5 589 466, 5 5580 859 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat.

Az antitestek kiváltására alkalmazott korin vagy fragmensei nem szükséges, hogy biológiai aktivitással rendelkezzenek, azonban immunogén aktivitásúnak kell lenniük. A korinspecifikus antitestek kiváltására alkalmazandó peptidek legalább öt aminosavból, előnyösen legalább tíz aminosavból álló szekvenciával rendelkezhetnek. A korin aminosavak rövid láncait, például az öt aminosavas láncokat más fehérjék, mint például kulcslyuk kagyló hemocianin láncaihoz vagy más felhasználható hordozóhoz fuzionálhatjuk, és az antitest-termelésre a kiméra molekulát használjuk fel.

Ahogy említettük, több különböző módszert alkalmazhatunk a korinspecifikus antitestek előállítására. Például az egyik módszerben, tisztított korinból (például reverz fázisú HPLC szeparációval tisztított korinból) származó denaturált korint nyerünk ki 75 mg-ig terjedő mennyiségben. Ezt a denaturált fehérjét alkalmazhatjuk egerek vagy nyulak immunizálására standard eljárás-

sal: körülbelül 100 mikrogramm elegendő egy egér immunizálására, míg egy nyúl immunizálására 1 mg-ig terjedő mennyiséget használhatunk. Az egér hibridómák azonosítására a denaturált fehérjét radioaktív jóddal jelölhetjük, és arra használhatjuk fel, hogy kiszűrjük azokat a potenciális egér B-sejt hibridómákat, melyek antitestet termelnek. Ehhez az eljáráshoz kis mennyiségű fehérjére van szükség, így 20 mg elegendő a jelöléshez és néhány ezer klón szűréséhez.

Egy másik módszerben, a korin egy cDNS-ből levezetett aminosav-szekvenciáját elemezzük ki, hogy meghatározzuk a nagy immunogenicitású régiókat. Megszintetizáljuk az ezeket a régiókat tartalmazó polipeptideket, és megfelelő immunizálási eljárásokban antitestek kiváltására alkalmazzuk. A megfelelő epitopok kiválasztására szolgáló elemzéseket Ausubel F. M. és munkatársai írták le [Current Protocols in Molecular Biology 2. kötet, John Wiley & Sons (1989)]. Az immunizációhoz optimális aminosav-szekvenciák általában a C-terminális vég, az N-terminális vég és a polipeptidnek azok a közbeeső hidrofíli régiói, melyek valószínűen a külső környezetnek ki vannak téve, amikor a fehérje a természetes konformációjában található meg. Jellemzően a kiválasztott polipeptideket, melyek körülbelül 15 aminosavgyök hosszúak, egy Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 431A-t alkalmazva szintetizáljuk meg fmoc-kémiát alkalmazva, és kulcslyuk kagyló hemocianinhez (KLH, Sigma) kapcsoljuk M-maleimidobenzóil-N-hidroxiszukcinimid észterrel [MBS, lásd Ausubel et al., fentebb] végzett reakcióval. Szükség esetén egy ciszteint építhetünk be a peptid N-terminálisára, hogy lehetővé tegyük a KLH-hoz való kapcsolást. Nyulakat immunizálunk a

peptid-KLH komplexszel komplett Freund adjuvánsban. A kapott antiszérumot anti-peptid aktivitásra teszteljük a peptidet műanyaghoz kötve, 1% BSA-val blokkolva, antiszérummal reagáltatva, mosva, és jelölt (radioaktívan vagy fluoreszcensen) affinitástisztított specifikus kecske anti-nyúl IgG-vel reagáltatva.

Antitestek hozhatók létre bármely kívánt régió vagy annak alrégiója ellen, például körülbelül a 46-66., 134-259., 450-573., 268-415., 579-690., 713-801., 802-1402. aminosavakból álló vagy ezt tartalmazó régiók ellen.

A hibridómákat is szokásos technikákat alkalmazva készíthetjük el és szűrhetjük. A kérdéses hibridómákat jelölt korinnal végzett szűréssel mutatjuk ki, hogy azonosítsuk azokat a fúziókat, melyek a kívánt specifitású monoklonális antitesteket termelik. Egy jellemző eljárásban a lemezek (FAST, Becton-Dickinson, Palo Alto, Calif) helyeit affinitás alapján tisztított specifikus nyúl-anti-egér (vagy megfelelő anti-adott faj IgG) antitestekkel fedjük 10 mg/ml koncentrációban. A fedett mérőhelyeket 1% BSA-val blokkoljuk, mossuk és a hibridómákból származó felülúszónak tesszük ki. Inkubálás után a sejteket jelölt korinnal kezeljük 1 mg/ml koncentrációban. Az antitesteket termelő klónok a jelölt korin egy bizonyos mennyiségét kötik, mely a háttért meghaladóan kimutatható. Az ilyen klónokat felfaporítjuk, és két klónozási ciklusnak vetjük alá határhígítással (1 sejt / 3 üreg). A klónozott hibridómákat prisztines egekbe oltjuk, hogy aszciteszt termeljünk, és a monoklonális antitestet az egér aszcitesz folyadékából affinitáskromatográfiával Protein A-n tisztítjuk. Jellemzően legalább 10^8 M, előnyösen 10^9 - 10^{10} M vagy erősebb affinitású monoklonális antitesteket kapunk a

Harlow és Lane által leírt standard eljárásokkal [Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] vagy Gading eljárásával [Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2. kiadás, Academic Press N.Y: (1986)].

Az adott korin antitestek olyan prepatológiai állapotok és krónikus és akut betegségek diagnosztizálására használhatóak fel, melyek a korin mennyiségi vagy megoszlási eltéréseivel jellemezhetők. A korin diagnosztikai tesztjei olyan módszereket foglalnak magukban, melyek antitestet és egy jelet alkalmaznak a korin kimutatására az emberben (vagy egérben, stb, ha egeret használunk, stb.), testfolyadékokban, szövetekben, az ilyen szövetek extraktumaiban (mint például szív- és porc szövetekben).

A találmány szerinti polipeptideket és antitesteket módosítással vagy módosítás nélkül használhatjuk fel. Gyakran a polipeptideket és antitesteket megjelöljük oly módon, hogy kovalensen vagy nem kovalensen egy olyan anyaghoz kapcsoljuk, ami egy kimutatható jelet biztosít. A jelzések és konjugációs módszerek széles köre ismert, és kiterjedten beszámolnak róla a tudományos és szabadalmi irodalomban is. Megfelelő jelek közé tartoznak a radionukleotidok, enzimek, szubsztrátok, kofaktorok, fluoreszcens ágensek, kemilumineszcens ágensek, mágneses részecskék és hasonlóak. Az ilyen jelzések alkalmazásának kitanítását tartalmazó szabadalmak közé tartoznak a 3 817 837, 3 850 752, 3 939 350, 3 996 345, 4 277 437, 4 275 149 és 4 366 241 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások. Úgy is előállíthatunk rekombináns immunglobulinokat, ahogy a 4 816 567 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban bemutatták, mely referenciaként a leírásba épül.

A szakterületen egy sor különböző eljárást ismerünk a szolubilis és membránkötött korin mérésére korinra specifikus poliklonális vagy monoklonális antitestek alkalmazásával. Ezek közé tartozik például az enzim-kapcsolt immunszorbens assay (ELISA), a radioimmunassay (RIA), és a fluoreszcens aktivált sejtosztályozás (FACS). Egy kéthelyes monoklonális alapú immunoassay-t részesítünk előnyben, melyben két egymásra nem ható epitopra reaktív monoklonális antitestet alkalmazunk, de kompetitív kötési assay-t is használhatunk. Ezeket az assay-eket már leírták, többek között Maddox Del. és munkatársai [J. Exp. Med. 158, 1211 (1983)].

Az antitesteket és más korinhoz kötődő ligandumokat különböző módokon használhatjuk fel, ezek közé tartozik a terápiás, diagnosztikai és kereskedelmi kutatási eszközként való alkalmazás, például a korin polipeptid mennyiségi mérésére állatokban, sejtekben, stb.; a sejtes elhelyezkedésük és/vagy megoszlásuk meghatározására; a korin vagy egy olyan polipeptid tisztítására, ami egy részét tartalmazza; funkciójának módosítására; Western foltokban, ELISA-ban, immunprecipitációban, RIA-ban való alkalmazásra, stb.

A találmány az ilyen assay-kre, és ezek végrehajtására szolgáló készítményekre és készletekre is vonatkozik. Ezeket és más módszereket alkalmazva egy találmány szerinti antitestet a korin polipeptid vagy fragmentumai kimutatására alkalmazhatjuk különböző mintákban, ide értve a szöveteket, sejteket, testfolyadékot, vért, vizeletet, agy-gerincvelői folyadékot. Egy találmány szerinti eljárás a következőkből áll: a) a szakterületen ismert módon, a kötés létrehozása szempontjából hatásos körülmények kö-

zött a mintával érintkezésbe hozunk egy ligandumot, mely a 2. vagy 3. szekvencia szerinti peptidet köti, és b) kimutatjuk a specifikus kötést a ligandum és a peptid között. A "specifikus kötés" azt jelenti, hogy a ligandum az aminosavak egy meghatározott szekvenciájához kapcsolódik, például a 2. vagy 3. szekvencia szerinti aminosav-szekvenciában vagy annak származékaiban lévő szekvenciához.

A természetes vagy rekombináns korint immunaffinitásos kromatográfiával tisztíthatjuk korin-specifikus antitesteket alkalmazva. Általában egy immunaffinitásos oszlopot úgy hozunk létre, hogy anti-korin antitesteket kapcsolunk kovalensen egy aktivált kromatográfiás gyantához. A poliklonális antitesteket immunszérumból, vagy ammónium-szulfátos kicsapással vagy immobilizált Protein A-n (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.) végzett tisztítással állítjuk elő. Hasonló módon a monoklonális antitesteket egér aszcitesz folyadékból állítjuk elő ammónium-szulfátos kicsapással vagy immobilizált Protein A-n végzett kromatográfiával. A részlegesen tisztított Ig-t kovalensen kapcsoljuk egy kromatográfiás gyantához, mint például CnBr-rel aktivált Sepharose-hoz (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.). Az antitestet a gyantához kapcsoljuk, a gyantát blokkoljuk, és az így kapott gyantát a gyártó útmutatásainak megfelelően mossuk.

A korin tisztításánál egy immunaffinitásos oszlopot alkalmazunk, mely során a korint tartalmazó sejtekből egy frakciót állítunk elő. Ez a készítmény származhat a teljes sejtből vagy egy olyan szubcelluláris frakcióból, melyet detergens hozzáadásával differenciálcentrifugálással vagy a szakterületen ismert más

eljárással kapunk. Alternatív megoldásként egy szignálszekvenciát tartalmazó szolubilis korin használható mennyiségben szekretáltatható a tápközegbe, melyben a sejt növekedik. Egy szolubilis korint tartalmazó készítményt nyomunk át az immunaffinitásos oszlopon, és az oszlopot olyan körülmények között, például egy detergens jelenlétében nagy ionerősségű pufferekben mossuk, mely lehetővé teszi a korin preferenciális abszorbanciáját. Ezután az oszlopot olyan körülmények között eluáljuk, mely megszünteti az antitest/korin kötést (például egy 2-3-as pH-jú pufferben vagy egy kaotróp anyag, mint például karbamid- vagy tiocianát-ion magas koncentrációjánál), és a korint összegyűjtjük.

Továbbá a találmány szerinti korinhoz vagy származékához kötődő ligandumok például szintetikus peptidkönyvtárakat vagy aptamereket alkalmazva is előállíthatók [például Pitrun et al., 5 143 854 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Geysen et al., J. Immunol. Methods 102, 259-274 (1987); Scott et al., Science 249, 386 (1990); Blackwell et al., Science 250, 1104 (1990); Tuerk et al., Science 249, 505 (1990)].

Az antitestek és származékaik a korin vagy fragmentuma expressziójának gátlására is felhasználhatóak. A korin polipeptid mennyiségét önmagában vagy más géntermékekkel együtt is meghatározhatjuk. Jellemzően a korin polipeptid mennyiségét (például expressziós szintjét) ugyanabban vagy egy eltérő mintában lévő másik polipeptidek, például aktin, mennyiségeivel hasonlíthatjuk össze (például arányként). Általánosságban a korinra specifikus reagenseket diagnosztikai és/vagy törvényszéki vizsgálatokban alkalmazhatjuk bármely kívánt módon, például

ahogy az 5 397 712, 5 434 050 és 5 429 947 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban ismertették.

A találmány egy kívánt módon, például az 5 434 050 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett módon előállított korin polipeptidre is vonatkozik. Egy jelölt polipeptidet például kötési assay-kben alkalmazhatunk, mint például a korinhoz kötődő vagy kapcsolódó anyagok meghatározására, a korin sejten belüli mozgásának nyomon követésére egy *in vitro*, *in vivo*, vagy *in situ* rendszerben, stb.

Egy találmány szerinti nukleinsav, polipeptid, antitest, korin, ligandum stb. izolált lehet. Az "izolált" kifejezés azt jelenti, hogy az anyag olyan formában van jelen, mely az eredeti környezetében nem volt megtalálható, például koncentráltabban, tisztábban, alkotórészekről elkülönítve, stb. Egy izolált nukleinsav magánban foglal például egy élő állatban található kromoszómális DNS-ből elkülönített korinszekvenciával rendelkező nukleinsavat. Ez a nukleinsav egy vektor része lehet, vagy egy kromoszómába inszertálódhatott (specifikus gécélzással, vagy random integrációval a normális helyzetétől eltérő pozícióba), és mégis izolált, amennyiben nem abban a formájában van jelen, ahogy a természetes környezetében megtalálható. Egy találmány szerinti nukleinsav vagy polipeptid lényegében tisztított lehet. A "lényegében tisztított" azt jelenti, hogy a nukleinsavat vagy polipeptidet elkülönítettük, és lényegében mentes más nukleinsavaktól vagy polipeptidektől, azaz a nukleinsav vagy polipeptid az elsődleges és aktív alkotórész.

A találmány transzgénikus állatokra is vonatkozik, például egy nem humán emlősre, mint például egy egérre, mely egy korint

tartalmaz, vagy a korinra ki van ütve (knock out). A transzgénikus állatokat ismert módszerek szerint állítjuk elő, ide tartozik például a rekombináns gének pronukleáris injekciója az egysejtes embriók pronukleuszába, mesterséges élesztőkromoszóma beépítése az embriogén őssejtekbe, gén-célbajuttatási módszerek, embrionális őssejt módszertan. Lásd például a 4 736 866, 4 873 191, 4 873 316, 5 082 779, 5 304 489, 5 174 986, 5 175 384, 5 175 385, 5 221 778 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat; Gordun és munkatársai művét [Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 7380-7384 (1980)], Palmiter és munkatársai műveit [Cell 41, 343-345 (1985); Ann. Rev. Genet. 20, 465-499 (1986); Askew és munkatársai művét [Mol. Cell. Bio. 13, 4115-4124 (1993)]; Games és munkatársai művét [Nature, 373, 523-527 (1995)], Valancius és Smithies művét [Mol. Cell. Bio. 11, 1402-1408 (1991)], Stacey és munkatársai művét [Mol. Cell. Bio. 14, 1009-1016 (1994)], Hasty és munkatársai művét [Nature 350, 243-246 (1995)], Rubinstein és munkatársai művét [Nucl. Acid. Res. 21, 2613-2617 (1993)]. Egy találmány szerinti nukleinsav bármely nem humán emlősbe bevihető, ezek közé tartozik az egér [Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), sertés [Hammer et al., Nature 315, 343-345 (1985)], birka [Hammer et al., Nature 315, 343-345 (1985)], szarvasmarha, patkány vagy főemlősök. Lásd még Church, Trends in Biotech. 5, 13-19 (1987), Clark et al., Trends in Biotech. 5, 20-24 (1987) és DePamphilis et al., BioTechniques, 6, 662-680. Továbbá rendelésre előállított transzgénikus patkányok és egerek kaphatók a kereskedelemben. Ezek a transzgénikus állatok hasznos állatmodellek a korin

funkciójának tesztelésére, egy kígyó táplálékként, genetikai markerekként a törzseredet kimutatására, stb. Az ilyen transzgénikus állatok továbbá más transzgéneket vagy azok knock-outjait is tartalmazhatják (például más szerinproteázokban, nátriuretikus peptidekben, stb.).

A korin gén több példányát, erős promóterek által irányított korin gént, vagy korin knock-outokat tartalmazó transzgénikus állatok a magas vérnyomás, vesebetegség és szívbetegség állatmodelljeiként használhatóak fel. Lásd például Steinhelper és munkatársai művét [Hypertension 16, 301-307 (1990)], John és munkatársai művét [Am. J. Physiol. 271, R109-R114 (1996)].

A találmány tehát egy olyan transzgénikus állatra, mint például rágcsálóra, egy egérre, egy patkányra vonatkozik, mely olyan sejteket tartalmaz, amik egy rekombináns korin gént tartalmaznak az említett sejt egy kromoszómájába integrálva a természetes korin gén lókuszánál, ahol az említett rekombináns korin gén egy olyan rekombináns korin polipeptidet kódoló nukleotid kódolószekvenciát tartalmaz, mely legalább egy olyan aminosavat tartalmaz, ami nem azonos és/vagy pozíciója nem olyan, mint ami az említett természetes korin génben a természetben előfordul. Egy ilyen rekombináns gént homológ rekombinációval állíthatunk elő, például egy humán korin génje és egy gazdaállat korin génje között a natív lókusznál.

A találmány egy olyan transzgénikus állatra, mint például egy egérre vagy egy patkányra is vonatkozik, mely olyan sejteket tartalmaz, melyek legalább egy funkcionálisan elrontott rekombináns korin gént tartalmaznak egy kromoszómális korin génlókuszon, ahol az említett elrontás meggátolja a korin gén

által kódolt korin polipeptid funkcionális expresszióját. A funkcionális inaktiváció vagy elromlás például egyetlen sejt, kiválasztott sejtek vagy egy emlős összes sejtjének endogén szerinproteáz génje által kódolt polipeptid legalább egy részének expressziójának részleges vagy teljes lecsökkenésére vonatkozik. Az ilyen csökkenés a pro-ANF-átalakító enzimaktivitás ezzel együtt járó csökkenését eredményezheti a fiziológiailag aktív ANF csökkenését okozva. A "knockout" kifejezés a gén funkcionális inaktivációjának szinonimája.

Az egyik megvalósítási módban egy géncélzó stratégiát alkalmazunk, hogy lehetővé tegyük egy kívánt nukleotidszekvenciának a bevitelét egy korin génbe. A géncélzó stratégia előnyösen kétszeres reciprok rekombinációt és egy pozitívan szelektálható markert alkalmaz, hogy elősegítse a nukleotidszekvencia inszercióját egy célnukleinsavba. A célnukleinsav előnyösen egy gén, előnyösebben egy adott kromoszómális lókuszon lévő gén. A kívánt nukleotidszekvenciát a génbe oly módon inszertáljuk, hogy a gént funkcionálisan elrontsuk, azaz az expresszióját részben vagy teljesen lecsökkentsük.

A korin gén módosítását a kromoszómális lókusznál bármely alkalmas módszerrel végrehajthatjuk, mint például homológ rekombinációval. Az utóbbit alkalmazhatjuk a korin gén elrontására, egy génmutáció bevitelére a korin génbe, DNS inszertálására vagy deletálására, stb. A szelekcióhoz és a homológ rekombinációhoz hatásos szekvenciákat ír le Deng és Capecchi [Mol. Cell. Bio. 12, 3365-3371 (1992)], Bollag és munkatársai [Annu. Rev. Genet. 23, 199-225 (1989)], Waldman és Liskay [Mol. Cell. Bio. 8, 5350-5357 (1988)], Rubinstein és munkatársai [Nucl. Acid Res. 21,

2613-2617 (1993), WO 94/23049 és WO 95/14377 számú nemzetközi közzétételi iratok.

A korin gén funkcionálisan teljesen el lehet rontva, például a gén 5' régiójának deletálásával. Alternatív lehetőségként a korin specifikus régióit módosíthatjuk. Például az emberi génben a katalitikus domént körülbelül a 802-1042. aminosav helyzetekben vagy az egér génben a megfelelő pozíciókat rekombinációval genetikailag megváltoztathatjuk, hogy módosított aktivitású korin termelődjön, ide értve a nullaktivitást, a megnövekedett aktivitást és a lecsökkent aktivitást is.

Általánosságban a találmány szerinti nukleinsavakat, polipeptideket, stb. úgy állíthatjuk elő, és úgy alkalmazhatjuk, ahogy az 5 501 969, 5 506 133, 5 441 870 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban, a WO 90/00607 és WO 91/15582 számú nemzetközi közzétételi iratokban leírták.

A nukleinsavak, polipeptidek, antitestek, stb. más aspektusai céljából a molekuláris biológia, fehérjetudomány és immunológia általános tankönyveire hivatkozunk. Lásd például Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevir Sciences Publishing, Inc. New York (1986); Hames et al., Nucleic Acid Hybridization IL Press (1985), Sambrook et al, Molecular Cloning; Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al. (szerk), John Wiley & Sons, Inc.; Current Protocols in Human Genetics, Nicholas C. Drpoli et al (szerk.), John Wiley & Sons, Inc.; Current Protocols in Protein Science John E. Coligan et al. (szerk.), John Wiley & Sons, Inc.; Current Protocols in Immunology, John E. Coligan et al. (szerk.), John Wiley & Sons, Inc.

Példák**Humán korin cDNS klónok izolálása**

Egy részleges EST szekvenciát azonosítottunk az Incyte EST adatbázis új szerinproteáz cDNS-ekre végzett analízise alapján. A klónt (307474) megrendeltük az Incyte-től. Egy klónból származó 2,1 kb-os EcoRI-XhoI fragmentumot használtuk egy humán szív cDNS könyvtár (Clontech) szűrésére. A 14b2 fágmidot, mely egy 3,8 kb-os inszertumot tartalmazott, egy darab pozitív fágból *in vivo* kivágással kinyertük. A 14b2 fágmidból származó oligoprimereket alkalmaztuk arra, hogy tovább klónozzuk az 5' vég cDNS szekvenciát 5' RACE-val, Marathon-ready humán szív cDNS-t (Clontech) alkalmazva templátként. A PCR terméket pCRII vektorba (Invitrogen) klónoztuk, és megszekvenáltuk. A teljes hosszúságú (azaz egy iníciációs kodonnal és egy terminációs kodonnal rendelkező) humán korin cDNS szekvenciát kaptuk meg az 5'-RACE-ből és fágmidból kapott szekvenciák összeszerkesztésével GCG DNS analízis csomagot alkalmazva.

Az 5' RACE-ban alkalmazott oligoprimerek:

PrWY109: 5'-CAGTTGGTTTGAACAAGTGCAGGG-3'

PrWY110: 5'-TGCAAGGAGGGATACGCTCGCCTG-3'

PRWY111: 5'-AATCCCAAGAACAGACTCACAGCG-3'

PRWY118: 5'-CGGGTCACAGAGAGAGCTACCACC-3'

PRWY119: 5'-GGTCTCCTTCTTGACATGAATCTG-3'

5' - AACAAAACGATCCTTGGAGGTCGGACGAGT-3'

Northern analízis:

A 307474 Incyte klónban lévő 2,1 kb-os EcoRI-XhoI fragmentumot ³²P-dCTP-vel jelöltük egy random primer jelölő készletet (Boehringer) alkalmazva. Humán Többszövetes Northern Blot I, Hu-

mán Többszövetes Northern Blot II, Humán Izom Northern Blot szűrőket (Clontech) hibridizáltunk a jelölt humán korin cDNS próbával. A Northern hibridizációt egy éjszakán át 42°C-on 40% formamid és 5X Denhardt oldat, 6X SSC, 100 µg/ml lazac sperma DNS, 0,1% SDS oldatával hajtottuk végre. A szűrőket 0,2X SSC, 0,1% SDS oldatával mostuk 60°C-on, és Fuji képelőhívó lemezekre exponáltuk.

Egér korin DNS klónozása

Az egér korin cDNS klónokat egy PCR alapú stratégiával izoláltuk. Egy egér szív cDNS könyvtárat vásároltunk a Clontechtől, és PCR amplifikáció templatjaként alkalmaztuk (30 ciklus: 1,5 perc anneálás 55°C-on, 1,5 perc lánchosszabbítás 72°C-on és 1 perc denaturálás 94°C-on). A PCR primerek szekvenciái a humán korin cDNS szekvenciákon alapulnak. Az egér cDNS amplifikációjához alkalmazott primerek:

Cor09: 5'-TCTTCTGTGTACTAAACAAGACTG-3'

Cor12: 5'-AGGCCCCAGGACTTTGGAAAAGCA-3'

Cor02: 5'-ACAGTGGCCTGAAGACACAGATTG-3'

Ptrowy128: 5'-ACAGAGCATCGCTGCGGGGACGGG-3'

A PCR reakciókból származó DNS-fragmentumokat pCRII vektorba klónoztuk. A független PCR reakciókból származó plazmid klónokat alkalmaztuk a további szekvenáláshoz. Az egér és humán korin cDNS-ek 85% feletti szekvencia-azonosságot mutattak.

In situ hibridizáció

RT-PCR-mRNS mintákat izoláltunk Hec-1-A, U2-OS, SK-LMS-1 és AN3-CA sejtekből egy kereskedelmi RNS preparációs készlettel (Oligotex Direct mRNA Mini Kits, QIAGEN). Egyszálú cDNS-eket szintetizáltunk SuperScript II Rn-áz reverz transzkriptázzal

(Life Technologies). Humán korinspecifikus oligonukleotid primereket (szensz primer: 5'-AACAAAAGGATCCTTGGAGGTCGGACGAGT-3' és antiszensz primer: 5'-CGGAGCCCCATGA AGTTAATCCA-3') alkalmaztunk a korin cDNS egy 630 bp-os fragmentumának amplifikálására a 2475. és 3105. nukleotidok között. Humán gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) génből származó TFR1 (5'-GTCAATGTCCCAAACGTCACCAGA-3') és TFR2 (5'-ATTCGGGAATGCTGAGAAAACAGACAGA-3') oligonukleotid primereket alkalmaztunk belső mennyiségmérő kontrollként. A PCR reakciókat egy termikus ciklizáló készülékkel hajtottuk végre (Perkin-Elmer, model 480). A PCR termékeket 1%-os agaróz géleken különítettük el, és etídium-bromidos festéssel tettük láthatóvá.

In situ hibridizáció

Egér felnőtt szív és embrionális szövetmetszeteket paraffinmentesítettünk xilolban, és 4% paraformaldehidben rögzítettük. A szöveteket proteináz K-val (20 mg/ml) emésztettük, majd trietanolamin/ecetsav anhidriddel kezeltük és víztelenítettük. Egy kódoló régióból származó 800 bp-os korin cDNS fragmentumot pCRII-be (Invitrogen) klónoztunk két orientációban, hogy a pM11 és pM41 plazmidokat megkapjuk. A plazmidokat HindIII emésztéssel linearizáltuk. Szensz és antiszensz próbákat szintetizáltunk T7 RNS polimerázt (T7/SP6 transzkripció kit, Boehringer Mannheim) alkalmazva, és [33P]UTP-vel (Amersham) jelöltük. A hibridizációt úgy hajtottuk végre, ahogy leírták (14). A tárgylemezeket víztelenítettük, és Kodak NTB-2 emulzióba mártottuk, és 4 héten át fénymentes dobozokban 4°C-on exponáltuk. A fotografikus előhívást egy Kodak D-19 előhívóban hajtottuk végre. A lemezeket hemotoxinnal és eozinnal festettük, és egy Zeiss mik-



roszkóp világos és sötét-mezőjű optikáját alkalmazva elemeztük.

Fluoreszcens In situ Hibridizáció (FISH) analízis:

A humán korin gént tartalmazó P1 fág klónokat filterhibridizálással izoláltuk egy humán korin DNS-t alkalmazva próbaként. Egy klónt DNS szekvenálással ellenőriztünk humán korin cDNS-ből származó primert alkalmazva. Ebből a P1 fágból származó DNS fragmentumot digoxigenin-dUTP-vel jelöltük. A jelölt próbát vágott humán DNS-sel egyesítettük, és PHA-val stimulált perifériális vér limfocitákból származó metafázisban lévő kromoszómákhoz hibridizáltuk 50% formamidot, 10% dextrán-szulfátot és 2xSSC-t tartalmazó oldatban. A hibridizációs jeleket fluoreszcensen jelölt anti-digoxigenin antitestekkel mutatuk ki, és DAPI-val (4,6-diaminoidino-2-fenilindol) utánfestettük. Összesen 80 metafázisos sejtet elemeztünk ki, ebből 74 sejt specifikus jelölődést mutatott.

A korin proteáz doménjének homológiamodellje

A korin proteáz domén (802-1042. aminosavak) egy modelljét építettük fel a szarvasmarha kimotripszin A szerkezete alapján 1,8 angströmös felbontásnál (15,16) Homology programot (Insight II, 1995, MSI, San Diego, CA) alkalmazva. Rotamereket alkalmaztunk a nem azonos oldallánc-helyettesítésekre (16). A hurokinszerciók koordinátáit a Brookhaven fehérje adatbankból vettük. A modellt energiaminimalizálással finomítottuk AMBER erőteret (Discover 95.0) alkalmazva, egy távolságfüggő dielektromos konstanssal. A minimum-meghatározáskor a legmeredekebb esés és a konjugált gradiens módszereket alkalmaztuk: először azoknál a hurkoknál, ahol az inszerciók és deléciók fordultak elő, majd az oldalláncoknál, és a minimalizálás utolsó köre

a Ca atomokat tartotta rögzítve. A korinnak azokat a gyökeket (His843, Asp892 és Ser985), melyek a mintaszerkezet katalitikus triádjának feleltek meg, szintén rögzítettük.

A korin biológiai aktivitása

Hagyományos módszerekkel több különböző sejtvonalat állítottunk elő, hogy mérjük a korin biológiai aktivitását. 293-as sejteket kotranszfektáltunk pro-ANF-fel és korin expressziós plazmidokkal. Két további sejtvonalat is létrehoztunk a 293-as sejteket egy pro-ANF-t expresszáló plazmiddal és egy hepszint vagy protrombint expresszáló plazmiddal kotranszfektálva. Csak a korint expresszáló sejtek alakították át a pro-ANF-et ANF-fé, melyet ANF elleni antitesteket alkalmazó Western folttal mutatunk ki.

Egy másik kísérletet is végrehajtottunk, melyben pro-ANF-et tartalmazó kondicionált tápközeget hoztunk érintkezésbe a korin polipeptidet expresszáló sejtekkel. Újra a pro-ANF ANF-fé alakult át. A hepszint vagy protrombint kifejező kontroll sejtek nem voltak hatással a pro-ANF-re.

Anélkül, hogy további részletekbe merülnénk, úgy véljük, hogy aki a szakterületen jártas, az előző leírást alkalmazva a találmányt teljes terjedelmében hasznosítani tudja. A korábbiakban ismertetett előnyös jellegzetes megvalósítási módokat ennek értelmében csupán a szemléltetés céljából alkottuk meg, és nem a leírás fennmaradó részének valamilyen módon történő korlátozására.

A fentebb és az ábrákon hivatkozott összes szabadalmi bejelentés, szabadalmi leírás, publikáció teljes leírása, a szekvenencia-azonosítószámmal rendelkező nukleinsavak, stb. teljes terje-

delmükben referenciaként a leírás részét képezik, ide értve az Unigene-től, PubEst-ből és GenBank adatbázisokból származó következő nukleinsav-fragmentumokat is: Hs.62794 (AA126468 [1686098], AA126648 [1686206], AA625395 [2537780], AA046682 [1524579], AA249850 [1881137] és AA046793 [1524691]) és Hs.71798 (AA147031 [1716421]); Hs.121626 (AA7711958), Hs.1657 (M69297), és Hs.47712(AA203291), g1231787; g1312726; g1337948; és g942724.

Aki a szakterületen jártas, az előző leírásból könnyen megtudja állapítani a találmány lényeges jellemzőit, és anélkül hogy eltérne a találmány lényegétől és oltalmi körétől, a találmányban különböző változtatásokat és módosításokat hajthat végre abból a célból, hogy azt különböző alkalmazásokhoz és körülményekhez igazítsa.

Szekvencialista

<110> Morser, John
Wu, Qingyu
Yan, Wei

<120> NOVEL SERINE PROTEASE NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES

<130> SCHERING AG

<140>

<141>

<150> 09/092,029

<151> 1998-06-05

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4933

<212> DNA

<213> Homo sapiens corin

<400> 1

```

aaatcatccg tagtgcctcc ccgggggaca cgtagaggag agaaaagcga ccaagataaa 60
agtggacaga agaataagcg agacttttta tccatgaaac agtctcctgc cctcgctccg 120
gaagagcgct accgcagagc cgggtcccca aagccggtct tgagagctga tgacaataac 180
atgggcaatg gctgctctca gaagctggcg actgctaacc tcctccggtt cctattgctg 240
gtcctgattc catgtatctg tgctctcggt ctcttgctgg tgatcctgct tcctatgtt 300
ggaacattac aaaagggtcta ttttaaatca aatgggagtg aacctttggt cactgatggt 360
gaaatccaag ggtccgatgt tattcttaca aatacaattt ataaccagag cactgtggtg 420
tctactgcac atcccgacca acacgttcca gcctggacta cggatgcttc tctcccaggg 480
gaccaaaagtc acaggaatac aagtgcctgt atgaacatca cccacagcca gtgtcagatg 540
ctgccctacc acgccacgct gacacctctc ctctcagttg tcagaaacat ggaaatggaa 600
aagtctctca agtttttcac atatctccat cgctcagtt gctatcaaca tatcatgctg 660
tttggtctga cctcgccctt ccctgagtg c atcattgatg gcgatgacag tcatggactc 720
ctgccctgta ggtctttctg tgaggctgca aaagaaggct gtgaatcagt cctggggatg 780
gtgaattact cctggccgga tttcctcaga tgctcccagt ttagaaacca aactgaaagc 840
agcaatgtca gcagaatttg cttctcacct cagcaggaaa acggaaagca attgctctgt 900
ggaaggggtg agaactttct gtgtgccagt ggaatctgca tccccgggaa actgcaatgt 960
aatggctaca acgactgtga cgactggagt gacgaggctc attgcaactg cagcgagaat 1020
ctgtttcact gtcacacagg caagtgcctt aattacagcc ttgtgtgtga tggatatgat 1080
gactgtgggg atttgagtga tgagcaaaac tgtgattgca atcccacaac agagcatcgc 1140
tgccgggacg ggcgctgcat cgccatggag tgggtgtgtg atggtgacca cgaactgtgtg 1200
gataagtcgg acgaggtcaa ctgctcctgt cacagccagg gtctggtgga atgcagaaat 1260
ggacaatgta tccccagcac gtttcaatgt gatggtgacg aggactgcaa ggatgggagt 1320
gatgaggaga actgcagcgt cattcagact tcatgtcaag aaggagacca aagatgcctc 1380
tacaatccct gccttgattc atgtggtggt agctctctct gtgacccgaa caacagtcctg 1440
aataactgta gtcaatgtga accaattaca ttggaactct gcatgaattt gccctacaac 1500
agtacaagtt atccaaatta ttttggccac aggactcaaa aggaagcatc catcagctgg 1560
gagtcttctc ttttccctgc acttggtcaa accaactgtt ataaatacct catgttcttt 1620
tcttgacca ttttggtacc aaaatgtgat gtgaatacag gcgagcgtat cctccttgc 1680
agggcattgt gtgaacactc taaagaacgc tgtgagctct tcttgggat tgtgggccta 1740
cagtggcctg aagacacaga ttgcagtc aa ttccagagg aaaattcaga caatcaaac 1800
tgctgatgc ctgatgaata tgtggaagaa tgctcaccta gtcatttcaa gtgccgcta 1860
ggacagtgtg tcttggtctc cagaagatgt gatggccagg ccgactgtga cgaatgacag 1920
gatgaggaaa actgtggttg taaagagaga gatctttggg aatgtccatc caataaaca 1980
tgtttgaaag acacagtgat ctgcgatggg tcccagact gccctgatta catggacgag 2040

```

```

aaaaactgct ctttttgcga agatgatgag ctggaatgtg caaaccatgc gtgtgtgtca 2100
cgtgacctgt ggtgtgatgg tgaagccgac tgctcagaca gttcagatga atgggactgt 2160
gtgacctctt ctataaatgt gaactcctct tcctttctga tgggttcacag agctgccaca 2220
gaacaccatg tgtgtgcaga tggctggcag gagatattga gtcagctggc ctgcaagcag 2280
atgggttttag gagaaccatc tgtgaccaa ttgatacagg aacaggagaa agagccgcgg 2340
tggctgacat tacactccaa ctgggagagc ctcaatggga ccactttaca tgaacttcta 2400
gtaaatgggc agtcttgtga gagcagaagt aaaatttctc ttctgtgtac taaacaagac 2460
tgtgggcgcc gccctgctgc ccgaatgaac aaaaggatcc ttggagggtc gacgagtgcg 2520
cctggaaggt ggcctatggc gtgttctctg cagagtgaac ccagtggaca tatctgtggc 2580
tgtgtcctca ttgccaaagaa gtgggttctg acagtggccc actgcttcga ggggagagag 2640
aatgctgcag ttgggaaagt ggtgcttggc atcaacaatc tagaccatcc atcagtgttc 2700
atgcagacac gctttgtgaa gaccatcatc ctgcattccc gctacagtgc agcagtgggt 2760
gactatgaca tcagcatcgt tgagctgagt gaagacatca gtgagactgg ctacgtccgg 2820
cctgtctgct tgcccaaccc ggagcagtggt ctagagcctg acacgtactg ctatatcaca 2880
ggctggggcc acatgggcaa taaaatgcc a tttaagctgc aagaggaga ggtccgcat 2940
atctctctgg aacattgtca gtccactctt gacatgaaga ccatcaccac tcggatgata 3000
tgtgtctggc atgagtctgg cacagtgtat tcatgcatgg gtgacagcgg tgggctctct 3060
gtttgtgaga agcctggagg acgggtggaca ttatttggat taacttcata gggctccgtc 3120
tgcttttcca aagtcctggg gccctggcgt ttatagtaatg tgcataatct cgtcgaatgg 3180
attaaaagac agattttacat ccagaccttt ctctctaaact aattataagg atgatcagag 3240
acttttgcga gctacactaa aagaaaatgg ccttcttgac tgtgaagagc tgccctgcaga 3300
gagctgtaca gaagcacttt tcatggacag aaatgctcaa tctgtgactg caaatttgca 3360
tgtttgtttt ggactaattt ttttcaattt attttttcac ctctattttt ctcttatttc 3420
aagttcaatg aaagacttta caaaagcaaa caaagcagac ttgtctcttt tgccaggcct 3480
aaccatgact gcagcacaaa attatcgact ctggcgagat ttaaaatcag gtgctacagt 3540
aacaggttat ggaatggctt cttttatcct atcacaaaaa aagacataga tatttaggct 3600
gattaattat ctctaccagt ttttgtttct caagctcagt gcatagtggg aaatttcagt 3660
gttaacattg gagacttgc tttctttttc tttttttata cccacaaatt cttttttatt 3720
acacttcgaa ttttagggta cacgagcaca acgtgcagggt tagttacata tgtatacatg 3780
tgccatgttg gtgtgctgaa cccagtaact cgtcatttga tttattaaaa gccaaagata 3840
tttcaagttt taaagtattt actattaccc ccttctaatt tttgcataat tctgagaact 3900
gataaaaagc agcaataaaa gaccagtgtc atccatttag gtagcaagac atattgaatg 3960
caaagtctct tagatatcaa tattaacact tgacattatt ggacccccca ttctggatgt 4020
atatcaagat cataatttta tagaagagtc tctatagaac tgcctcaca gctgggtttg 4080
ttcaggatat atgagttggc tgattgagac tgcaacaact acatctatat ttatgggcaa 4140
tattttgttt tacttatgtg gcaaagaact ggatattaaa ctttgcaaaa gagaatttag 4200
atgagagatg caatttttta aaaagaaaaa taatttgcac cctctgttta attaaattta 4260
ttttcagtt ttttgcgtt catccatacc aacaaagtca taaagagcat attttagagc 4320
acagtaagac ttgtcatgga gtaaaacatt ttgtaatttt cctcaaaaga tgtttaatat 4380
ctggtttctt ctcatggta attaaaattt tagaaatgat ttttagctct aggccacttt 4440
acgcaactca atttctgaag caattagtgg taaaaagtat ttttccccac taaaaaactt 4500
taaaacacaa atcttcatat atacttaatt taattagtca ggcatccatt ttgcctttta 4560
aacaactagg attccctact aacctccacc agcaacctgg actgcctcag cattccaaat 4620
agatactacc tgcaatttta tacatgtatt tttgtatctt ttctgtgtgt aaacatagtt 4680
gaaattcaaa aagttgtagc aatttctata ctattcatct cctgtccttc agtttgtata 4740
aacctaagga gagtgtgaaa tccagcaact gaattgtggg cacgattgta tgaaagttca 4800
agaacatatg tcagttttgt tacagttgta gctacatact caatgtatca acttttagcc 4860
tgctcaactt aggtctcagt aaatatatat attatactta ttttaataaa ttcttaatac 4920
aaataaaatg gta 4930

```

<210> 2

<211> 1042

<212> PRT

<213> Homo sapiens corin

<400> 2

```

Met Lys Gln Ser Pro Ala Leu Ala Pro Glu Glu Arg Tyr Arg Arg Ala
  1                      5                      10                      15

```

```

Gly Ser Pro Lys Pro Val Leu Arg Ala Asp Asp Asn Asn Met Gly Asn

```

65

	20		25		30	
Gly Cys Ser	Gln Lys Leu Ala Thr Ala Asn Leu Leu Arg Phe Leu Leu					
35			40		45	
Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Val Leu Leu Leu Val Ile						
50		55		60		
Leu Leu Ser Tyr Val Gly Thr Leu Gln Lys Val Tyr Phe Lys Ser Asn						
65		70		75		80
Gly Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ile Gln Gly Ser Asp Val						
	85		90		95	
Ile Leu Thr Asn Thr Ile Tyr Asn Gln Ser Thr Val Val Ser Thr Ala						
	100		105		110	
His Pro Asp Gln His Val Pro Ala Trp Thr Thr Asp Ala Ser Leu Pro						
115		120		125		
Gly Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Ala Cys Met Asn Ile Thr His						
130		135		140		
Ser Gln Cys Gln Met Leu Pro Tyr His Ala Thr Leu Thr Pro Leu Leu						
145		150		155		160
Ser Val Val Arg Asn Met Glu Met Glu Lys Phe Leu Lys Phe Phe Thr						
	165		170		175	
Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Met Leu Phe Gly Cys						
	180		185		190	
Thr Leu Ala Phe Pro Glu Cys Ile Ile Asp Gly Asp Asp Ser His Gly						
	195		200		205	
Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu Gly Cys Glu						
	210		215		220	
Ser Val Leu Gly Met Val Asn Tyr Ser Trp Pro Asp Phe Leu Arg Cys						
225		230		235		240
Ser Gln Phe Arg Asn Gln Thr Glu Ser Ser Asn Val Ser Arg Ile Cys						
	245		250		255	
Phe Ser Pro Gln Gln Glu Asn Gly Lys Gln Leu Leu Cys Gly Arg Gly						
	260		265		270	
Glu Asn Phe Leu Cys Ala Ser Gly Ile Cys Ile Pro Gly Lys Leu Gln						
	275		280		285	
Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp Glu Ala His Cys						
	290		295		300	
Asn Cys Ser Glu Asn Leu Phe His Cys His Thr Gly Lys Cys Leu Asn						
305		310		315		320
Tyr Ser Leu Val Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly Asp Leu Ser Asp						
	325		330		335	
Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Pro Thr Thr Glu His Arg Cys Gly Asp						

340										345					350				
Gly	Arg	Cys 355	Ile	Ala	Met	Glu	Trp 360	Val	Cys	Asp	Gly	Asp 365	His	Asp	Cys				
Val	Asp 370	Lys	Ser	Asp	Glu	Val 375	Asn	Cys	Ser	Cys	His 380	Ser	Gln	Gly	Leu				
Val 385	Glu	Cys	Arg	Asn	Gly 390	Gln	Cys	Ile	Pro	Ser 395	Thr	Phe	Gln	Cys	Asp 400				
Gly	Asp	Glu	Asp	Cys 405	Lys	Asp	Gly	Ser	Asp 410	Glu	Glu	Asn	Cys	Ser 415	Val				
Ile	Gln	Thr	Ser 420	Cys	Gln	Glu	Gly	Asp 425	Gln	Arg	Cys	Leu	Tyr 430	Asn	Pro				
Cys	Leu	Asp 435	Ser	Cys	Gly	Gly	Ser 440	Ser	Leu	Cys	Asp	Pro 445	Asn	Asn	Ser				
Leu	Asn 450	Asn	Cys	Ser	Gln	Cys 455	Glu	Pro	Ile	Thr	Leu 460	Glu	Leu	Cys	Met				
Asn 465	Leu	Pro	Tyr	Asn	Ser 470	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asn 475	Tyr	Phe	Gly	His	Arg 480				
Thr	Gln	Lys	Glu 485	Ala	Ser	Ile	Ser	Trp	Glu 490	Ser	Ser	Leu	Phe	Pro 495	Ala				
Leu	Val	Gln 500	Thr	Asn	Cys	Tyr	Lys	Tyr 505	Leu	Met	Phe	Phe	Ser 510	Cys	Thr				
Ile	Leu	Val 515	Pro	Lys	Cys	Asp	Val 520	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg 525	Ile	Pro	Pro				
Cys	Arg 530	Ala	Leu	Cys	Glu	His 535	Ser	Lys	Glu	Arg	Cys 540	Glu	Ser	Val	Leu				
Gly 545	Ile	Val	Gly	Leu	Gln 550	Trp	Pro	Glu	Asp	Thr 555	Asp	Cys	Ser	Gln	Phe 560				
Pro	Glu	Glu	Asn 565	Ser	Asp	Asn	Gln	Thr	Cys 570	Leu	Met	Pro	Asp	Glu 575	Tyr				
Val	Glu	Glu	Cys 580	Ser	Pro	Ser	His	Phe 585	Lys	Cys	Arg	Ser	Gly 590	Gln	Cys				
Val	Leu	Ala 595	Ser	Arg	Arg	Cys	Asp 600	Gly	Gln	Ala	Asp	Cys 605	Asp	Asp	Asp				
Ser	Asp 610	Glu	Glu	Asn	Cys	Gly 615	Cys	Lys	Glu	Arg	Asp 620	Leu	Trp	Glu	Cys				
Pro 625	Ser	Asn	Lys	Gln	Cys 630	Leu	Lys	His	Thr	Val 635	Ile	Cys	Asp	Gly	Phe 640				
Pro	Asp	Cys	Pro 645	Asp	Tyr	Met	Asp	Glu	Lys 650	Asn	Cys	Ser	Phe	Cys 655	Gln				
Asp	Asp	Glu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asn	His	Ala	Cys	Val	Ser	Arg	Asp	Leu				

660							665							670						
Trp	Cys	Asp	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Glu	Trp	Asp					
		675					680					685								
Cys	Val	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Ser	Ser	Ser	Phe	Leu	Met	Val					
	690					695					700									
His	Arg	Ala	Ala	Thr	Glu	His	His	Val	Cys	Ala	Asp	Gly	Trp	Gln	Glu					
705					710					715					720					
Ile	Leu	Ser	Gln	Leu	Ala	Cys	Lys	Gln	Met	Gly	Leu	Gly	Glu	Pro	Ser					
				725					730					735						
Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Gln	Glu	Gln	Glu	Lys	Glu	Pro	Arg	Trp	Leu	Thr					
			740					745					750							
Leu	His	Ser	Asn	Trp	Glu	Ser	Leu	Asn	Gly	Thr	Thr	Leu	His	Glu	Leu					
		755					760					765								
Leu	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Cys	Glu	Ser	Arg	Ser	Lys	Ile	Ser	Leu	Leu					
	770					775					780									
Cys	Thr	Lys	Gln	Asp	Cys	Gly	Arg	Arg	Pro	Ala	Ala	Arg	Met	Asn	Lys					
785					790					795				800						
Arg	Ile	Leu	Gly	Gly	Arg	Thr	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg	Trp	Pro	Trp	Gln					
				805					810					815						
Cys	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Pro	Ser	Gly	His	Ile	Cys	Gly	Cys	Val	Leu					
			820					825					830							
Ile	Ala	Lys	Lys	Trp	Val	Leu	Thr	Val	Ala	His	Cys	Phe	Glu	Gly	Arg					
		835					840					845								
Glu	Asn	Ala	Ala	Val	Trp	Lys	Val	Val	Leu	Gly	Ile	Asn	Asn	Leu	Asp					
	850					855					860									
His	Pro	Ser	Val	Phe	Met	Gln	Thr	Arg	Phe	Val	Lys	Thr	Ile	Ile	Leu					
865					870					875				880						
His	Pro	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ala	Val	Val	Asp	Tyr	Asp	Ile	Ser	Ile	Val					
				885					890					895						
Glu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Thr	Gly	Tyr	Val	Arg	Pro	Val	Cys					
			900					905					910							
Leu	Pro	Asn	Pro	Glu	Gln	Trp	Leu	Glu	Pro	Asp	Thr	Tyr	Cys	Tyr	Ile					
		915					920					925								
Thr	Gly	Trp	Gly	His	Met	Gly	Asn	Lys	Met	Pro	Phe	Lys	Leu	Gln	Glu					
	930					935					940									
Gly	Glu	Val	Arg	Ile	Ile	Ser	Leu	Glu	His	Cys	Gln	Ser	Tyr	Phe	Asp					
945					950					955				960						
Met	Lys	Thr	Ile	Thr	Thr	Arg	Met	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Glu	Ser	Gly					
				965					970											

980 985 990
 Lys Pro Gly Gly Arg Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser
 995 1000 1005
 Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser
 1010 1015 1020
 Tyr Phe Val Glu Trp Ile Lys Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu
 1025 1030 1035 1040
 Leu Asn

<210> 3
 <211> 3547
 <212> DNA
 <213> Murine corin

<400> 3
 gtggcagacg gtccctcact cctgtggcct ggcgtaggag acgctggcag tcatgggcag 60
 ggtttccttc agcggttcggg tcagctccgt gcggagagcc cgctgctctt gtccctgggcg 120
 atgctacctc tctgcagag tccctccaac caccgccctc cgtgcaactga acgggtcttg 180
 ctgcgcgggg gttccggggg agactgcagg tggagccgtc ggacccggcc ccttggggac 240
 ccgtggcctc ctctccgggt ccaagttcca ggctcccggc agctggaagg attgctttgg 300
 agccccgcct gctccagacg tcttgagagc agacaggagc gtgggcgagg gctgtcctca 360
 gaagctggtg actgctaact tgctgcgctt cctcctgctg gtgctcatcc cctgcactctg 420
 cgccctcatc gtgctgctgg ccctcctgct gtcctttgtg ggaacattaa aaagggttta 480
 tttcaaatca aatgacagtg aacctttggt cactgatggg gaagctcgag tgctgtgtgt 540
 tattcctgta aatacagttt attatgagaa cacaggggcg ccctctctgc cccccagcca 600
 gtccactcca gcctggacac cgagagctcc ttctccagag gaccagagtc acaggaacac 660
 aagcacctgc atgaacatca ctacacagcca gtgtcaaat ctgccctacc acagcacgtt 720
 ggcacctctc ttgccaatgt tcaaaaacat ggacatggag aagtctctca agttctctca 780
 gtacctccat cgctcagtt gctatcaaca tatcctgctc ttcggtctga gcctgcctt 840
 cctgagtgat gttgttgatg gcgatgacag gcaagggtct ctacctgta gatctttctg 900
 tgaggctgct aaagaaggat gcgaatctgt cctgggaatg gtgaactcct cctggccgga 960
 ttccctcaga tgctctcagt ttagggacca cactgagact aacagcagtg tcagaaagag 1020
 ctgcttctca ctgcagcagg aacatggaaa gcaatcactc tgtggagggg gcgagagctt 1080
 cctgtgtacc agcgggctct gcgtcccca gaagctgcag tgtaacggct ataagtactg 1140
 tgatgactgg agcgacgagg cgcattgcaa ctgcagcaag gatctgttcc actgtggcac 1200
 aggcaagtgc ctccattaca gcctcttggt tgatgggtac gatgactgtg gggacctgag 1260
 tgacgagcaa aactgtgatt gtaatctcac aaaagagcat cgctgtggag atggggcgctg 1320
 cattgcggct gagggtgtgt gcgatgggga ccatgactgt gtggacaagt ctgatgaggt 1380
 caactgctct tgtcacagcc agggcctggt ggaatgcaga agtgacagat gcatccctag 1440
 caccttccag tgtgatgggg acgaagactg taaggatggg agtgacgagg agaactgcag 1500
 tgacagtcag acgccatgtc cagaaggaga acagggatgc cttggcagtt cctgcgtcga 1560
 atcctgtgct ggtagctctc tgtgtgactc agacagcagc ctgagtaact gcagtcaatg 1620
 tgagcccatc actttggaac tctgcatgaa tttgccctac aaccatacac attatccaaa 1680
 ttaccttggc cacagaactc aaaaggaagc gtccatcagc tgggagtcac cccttttccc 1740
 tgcccttgta caaaccact gttacaaata cctcatgttt ttgcttgca ccattttggt 1800
 tccaaagtgt gatgtgaata caggacaacg catccgcctc tgcagactcc tgtgtgagca 1860
 ctccaaagag cgctgtgagt ctgttctggg aatcgttggc ctgcagtggc ctgaagacac 1920
 cgactgcaat caatttccag aggaaagtcc agacaatcaa acttgccctc tgcccaatga 1980
 agatgtggaa gaatgctctc cgagtcactt caaatgccgc tcgggacgat gcgttctggg 2040
 ctccaggaga tgtgacggcc aggtgactg tgacgacgac agtgacgagg aqaactgtgg 2100
 ttgtaaaag agagctcttt gggaaatgtcc atttaataag caatgtctga agcatatatt 2160
 aatctgcgat ggggttccag attgtccaga cagtatggat gaaaaaaact gctcattttg 2220
 ccaagacaat gagctggaat gtgccaacca tgagtgtgtg ccgcgtgacc tttgtgtcga 2280
 cggatgggtc gactgctcag acagtctgta tgaatggggc tgtgtgacct tctctaaaaa 2340

```

tgggaactct tctcattgc tgactgttca caaatctgca aaggaacacc acgtgtgtgc 2400
tgacggctgg cgggagacgt tgagtcagct ggcccgcaag cagatgggtt taggagaacc 2460
gtctgtgacc aagctgatcc caggacagga aggccagcag tggctgaggt tgtaccccaa 2520
ctgggagaat ctcaatggga gcaccttgca ggagctgctg gtatacaggc actcctgccc 2580
aagcagaagt gagatttccc ttctgtgctc caagcaagac tgtggccgcc gccctgctgc 2640
ccgaatgaac aagaggatcc ttgggggtcg gactagtcgt cctgggaggt ggccgtggca 2700
gtgctctctg cagagtgaac ccagtggaca tatctgtggc tgtgtcctca ttgccaagaa 2760
gtgggtcctg acagttgccc attgctttga agggagagaa gacgctgatg tttggaaagt 2820
ggtatttggc ataaacaacc tggaccatcc atcaggcttc atgcagaccc gctttgtgaa 2880
gacctcctg ctacatcccc gttacagtgc agcagtggta gactatgata tcagcgtggg 2940
ggagctgagc gatgatatca atgagacaag ctacgtcaga cctgtctgcc taccagatcc 3000
ggaggagtat ctagaaccag atacgtactg ctacatcaca ggctggggcc acatgggcaa 3060
taaaatgccc tttaaagctgc aggagggaga ggtccgcatt atccctctgg agcagtgcca 3120
gtcctatttt gacatgaaga ccatcaccaa tcggatgatc tgtgctggct atgagtctgg 3180
caccgtggac tctgtcatgg gagacagcgg tgggcctctg gtttgtgaac gaccggagg 3240
acagtggaca ttatttggtt taacttcagt gggctccgtc tgcttttcca aagttctggg 3300
acctggagtg tacagcaatg tgtcttactt tgtgggctgg attgaaagac aaatatatat 3360
ccagaccttt ctccaaaaga aatcccaagg ataatcagag actttgtggg gaaacctaca 3420
tgagaaatga cctctgaaa cagaagcttg tctgccaag agctgtacga acaggcggtt 3480
cacggacagg acgtctcaaca tgcaccgcaa gatctctcct gtttgtgcta gatgagttt 3540
actcagg

```

<210> 4

<211> 1113

<212> PRT

<213> Murine corin

<400> 4

```

Met Gly Arg Val Ser Phe Ser Val Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Ala
 1              5              10              15

Arg Cys Ser Cys Pro Gly Arg Cys Tyr Leu Ser Cys Arg Val Pro Pro
              20              25              30

Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Asn Gly Leu Gly Cys Ala Gly Val Pro
      35              40              45

Gly Glu Thr Ala Gly Gly Ala Val Gly Pro Gly Pro Leu Gly Thr Arg
      50              55              60

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

Cys Phe Gly Ala Pro Pro Ala Pro Asp Val Leu Arg Ala Asp Arg Ser
              85              90              95

Val Gly Glu Gly Cys Pro Gln Lys Leu Val Thr Ala Asn Leu Leu Arg
      100              105              110

Phe Leu Leu Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Ile Val Leu
      115              120              125

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

Lys Ser Asn Asp Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ala Arg Val
      145              150              155              160

Pro Gly Val Ile Pro Val Asn Thr Val Tyr Tyr Glu Asn Thr Gly Ala
      165              170              175

```

Pro Ser Leu Pro Pro Ser Gln Ser Thr Pro Ala Trp Thr Pro Arg Ala
 180 185 190
 Pro Ser Pro Glu Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Thr Cys Met Asn
 195 200 205
 Ile Thr His Ser Gln Cys Gln Ile Leu Pro Tyr His Ser Thr Leu Ala
 210 215 220
 Pro Leu Leu Pro Ile Val Lys Asn Met Asp Met Glu Lys Phe Leu Lys
 225 230 235 240
 Phe Phe Thr Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Leu Leu
 245 250 255
 Phe Gly Cys Ser Leu Ala Phe Pro Glu Cys Val Val Asp Gly Asp Asp
 260 265 270
 Arg Gln Gly Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu
 275 280 285
 Gly Cys Glu Ser Val Leu Gly Met Val Asn Ser Ser Trp Pro Asp Ser
 290 295 300
 Leu Arg Cys Ser Gln Phe Arg Asp His Thr Glu Thr Asn Ser Ser Val
 305 310 315 320
 Arg Lys Ser Cys Phe Ser Leu Gln Gln Glu His Gly Lys Gln Ser Leu
 325 330 335
 Cys Gly Gly Gly Glu Ser Phe Leu Cys Thr Ser Gly Leu Cys Val Pro
 340 345 350
 Lys Lys Leu Gln Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp
 355 360 365
 Glu Ala His Cys Asn Cys Ser Lys Asp Leu Phe His Cys Gly Thr Gly
 370 375 380
 Lys Cys Leu His Tyr Ser Leu Leu Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly
 385 390 395 400
 Asp Leu Ser Asp Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Leu Thr Lys Glu His
 405 410 415
 Arg Cys Gly Asp Gly Arg Cys Ile Ala Ala Glu Trp Val Cys Asp Gly
 420 425 430
 Asp His Asp Cys Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His
 435 440 445
 Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys Arg Ser Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr
 450 455 460
 Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu
 465 470 475 480
 Asn Cys Ser Asp Ser Gln Thr Pro Cys Pro Glu Gly Glu Gln Gly Cys
 485 490 495

Leu Gly Ser Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Gly Ser Ser Leu Cys Asp
 500 505 510
 Ser Asp Ser Ser Leu Ser Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu
 515 520 525
 Glu Leu Cys Met Asn Leu Pro Tyr Asn His Thr His Tyr Pro Asn Tyr
 530 535 540
 Leu Gly His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser
 545 550 555 560
 Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe
 565 570 575
 Phe Ala Cys Thr Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Gln
 580 585 590
 Arg Ile Pro Pro Cys Arg Leu Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys
 595 600 605
 Glu Ser Val Leu Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp
 610 615 620
 Cys Asn Gln Phe Pro Glu Glu Ser Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Leu
 625 630 635 640
 Pro Asn Glu Asp Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg
 645 650 655
 Ser Gly Arg Cys Val Leu Gly Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp
 660 665 670
 Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Ala
 675 680 685
 Leu Trp Glu Cys Pro Phe Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Leu Ile
 690 695 700
 Cys Asp Gly Phe Pro Asp Cys Pro Asp Ser Met Asp Glu Lys Asn Cys
 705 710 715 720
 Ser Phe Cys Gln Asp Asn Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Glu Cys Val
 725 730 735
 Pro Arg Asp Leu Trp Cys Asp Gly Trp Val Asp Cys Ser Asp Ser Ser
 740 745 750
 Asp Glu Trp Gly Cys Val Thr Leu Ser Lys Asn Gly Asn Ser Ser Ser
 755 760 765
 Leu Leu Thr Val His Lys Ser Ala Lys Glu His His Val Cys Ala Asp
 770 775 780
 Gly Trp Arg Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu
 785 790 795 800
 Gly Glu Pro Ser Val Thr Lys Leu Ile Pro Gly Gln Glu Gly Gln Gln
 805 810 815

Trp Leu Arg Leu Tyr Pro Asn Trp Glu Asn Leu Asn Gly Ser Thr Leu
 320 825 830
 Gln Glu Leu Leu Val Tyr Arg His Ser Cys Pro Ser Arg Ser Glu Ile
 835 840 845
 Ser Leu Leu Cys Ser Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg
 850 855 860
 Met Asn Lys Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp
 865 870 875 880
 Pro Trp Gln Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly
 885 890 895
 Cys Val Leu Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe
 900 905 910
 Glu Gly Arg Glu Asp Ala Asp Val Trp Lys Val Val Phe Gly Ile Asn
 915 920 925
 Asn Leu Asp His Pro Ser Gly Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr
 930 935 940
 Ile Leu Leu His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile
 945 950 955 960
 Ser Val Val Glu Leu Ser Asp Asp Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Val Arg
 965 970 975
 Pro Val Cys Leu Pro Ser Pro Glu Glu Tyr Leu Glu Pro Asp Thr Tyr
 980 985 990
 Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys
 995 1000 1005
 Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg Ile Ile Pro Leu Glu Gln Cys Gln Ser
 1010 1015 1020
 Tyr Phe Asp Met Lys Thr Ile Thr Asn Arg Met Ile Cys Ala Gly Tyr
 1025 1030 1035 1040
 Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 1045 1050 1055
 Val Cys Glu Arg Pro Gly Gly Gln Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser
 1060 1065 1070
 Trp Gly Ser Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser
 1075 1080 1085
 Asn Val Ser Tyr Phe Val Gly Trp Ile Glu Arg Gln Ile Tyr Ile Gln
 1090 1095 1100
 Thr Phe Leu Gln Lys Lys Ser Gln Gly
 1105 1110

<210> 5

<211> 24

<212> DNA
<213> Human corin

<400> 5
cagtttggtt gaacaagtgc aggg 24

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Human Corin

<400> 6
tgcaaggagg gatacgctcg cctg 24

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Human corin

<400> 7
aatccaaga acagactcac agcg 24

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Human corin

<400> 8
cgggtcacag agagagctac cacc 24

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Human corin

<400> 9
ggtctccttc ttgacatgaa tctg 24

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Human corin

<400> 10
aacaaaacga tccttgagg tcggacgagt 30

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Mouse corin

<400> 11
tcttctgtgt actaaacaag actg 24

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Mouse corin

<400> 12

aggccccagg acrtttggaaa agca	24
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Mouse corin	
<400> 13	24
acagtggcct gaagacacag attg	
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Human corin	
<400> 14	24
acagagcatc gctgcgggga cggg	
<210> 15	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Human corin	
<400> 15	30
aacaaaagga tccttggagg tcggacgagt	
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Human corin	
<400> 16	23
cggagcccca tgaagttaat cca	
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Human GAPDH	
<400> 17	24
gtcaatgtcc caaacgtcac caga	
<210> 18	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Human GAPDH	
<400> 18	29
atttcgggaa tgctgagaaa acagacaga	

Szabadalmi igénypontok

1. Izolált, teljes hosszúságú humán korin polipeptid, mely a 2. szekvenciában bemutatott 1-1042. aminosavakat tartalmazza.

2. Az 1. igénypont szerinti humán korin polipeptid, melyet az 1. szekvenciában bemutatott DNS szekvencia kódol.

3. Izolált nukleinsav, mely a 2. szekvenciában bemutatott 1-1042. aminosavakat tartalmazó teljes hosszúságú humán korin polipeptidet kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazza, és egy klónozó vektorban van jelen.

4. A 3. igénypont szerinti izolált nukleinsav, mely az 1. szekvenciában bemutatott nukleotidszekvenciával rendelkezik.

5. Vektor, mely a 3. igénypont szerinti, 2. szekvenciában bemutatott nukleinsavat tartalmazza.

6. Eljárás a 2. szekvenciában bemutatott és az 1. szekvenciában bemutatott nukleinsav által kódolt, teljes hosszúságú humán korin kifejezésére transzformált gazdasejtekben, azzal jellemezve, hogy az 1. szekvencia szerinti nukleinsavat tartalmazó transzformált gazdasejteket a 2. szekvencia szerinti polipeptid expresszálása szempontjából hatásos körülmények között tenyésztjük, és az említett polipeptidet tartalmazó említett gazdasejtek membránfrakcióját izoláljuk.

7. Eljárás egy humán korin polipeptid aktivitás szerinproteáz katalitikus aktivitási modulátorainak azonosítására, azzal jellemezve, hogy

egy tesztvegyület jelenlétében egy emlős korin polipeptidet és egy kromogén szerinproteáz szubsztrátot reagáltatunk olyan hatásos körülmények között, melynél az említett polipeptid az

említett szubsztrátot hasítja, ez egy kimutatható szín megjelenését eredményezi; kimutatjuk az említett hasítást; és megállapítjuk, hogy a tesztvegyület módosította-e a szerinproteáz aktivitást úgy, hogy összehasonlítjuk a tesztvegyület jelenlétében és anélkül mért hasítás mértékét.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett emlős korin polipeptid a 2. szekvenciában bemutatott 1. aminosavtól a 1042. aminosavig terjedő szekvenciával rendelkezik.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett emlős korin polipeptid az 1. szekvenciában bemutatott nukleinsav-szekvencia szekvenciájával rendelkezik.

10. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett emlős korin polipeptid a 4. szekvenciában bemutatott 1. aminosavtól a 1113. aminosavig terjedő szekvenciával rendelkezik.

11. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett emlős korin polipeptid a 3. szekvenciában bemutatott nukleinsav-szekvencia szekvenciájával rendelkezik.

12. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a szubsztrát pro-ANF.

A meghatalmazott:

Parragh Gáborné dr.
Parragh Gáborné dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

76 oldal

JH

2001. 08. 17.