

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520056

(P2004-520056A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int.C1.⁷**C12N 15/09****C12N 9/06**

F 1

C 12 N 15/00

C 12 N 9/06

Z N A A

B

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4

4 B 0 5 0

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 87 頁)

(21) 出願番号	特願2002-566373 (P2002-566373)
(86) (22) 出願日	平成14年2月18日 (2002.2.18)
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月13日 (2003.8.13)
(86) 國際出願番号	PCT/SE2002/000277
(87) 國際公開番号	W02002/066669
(87) 國際公開日	平成14年8月29日 (2002.8.29)
(31) 優先権主張番号	0100625-3
(32) 優先日	平成13年2月23日 (2001.2.23)
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)
(31) 優先権主張番号	60/272,247
(32) 優先日	平成13年2月28日 (2001.2.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人	501354233 ビオヴィトルム・アクチボラゲット B i o v i t r u m A B スウェーデン、エスエー-112 76ス トックホルム
(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葵
(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(74) 代理人	100064610 弁理士 中嶋 正二
(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】可溶性SSAOの精製のための方法

(57) 【要約】

本発明は、可溶性形態ヒトSSAO(セミカルバジド感受性アミンオキシダーゼ)、選択可能融合パートナー、シグナルペプチド；およびプロテアーゼ切断部位を含む融合タンパク質をコードするスクレオチド配列を含む組換え構築物に関する。当該構築物は、ヒトSSAOの可溶性形態の生成のための方法において有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(i) 宿主細胞からの融合タンパク質の分泌を指令するシグナルペプチド、
(ii) ヒトセミカルバジド感受性アミンオキシダーゼ (SSAO) の可溶性形態、
(iii) ヒトSSAOの可溶性形態のダイマー化を、可能とする融合パートナー、および
(iv) 該ヒトSSAOの可溶性形態と該融合パートナーの間に位置するプロテアーゼ切
断部位、
を含む、分泌される融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項 2】

該ヒトSSAOの可溶性形態が、配列番号2のアミノ酸29ないし763またはそのフラ
グメントを含む、請求項1の核酸。 10

【請求項 3】

該融合タンパク質が、ベンジルアミンオキシダーゼ活性を有する、請求項2の核酸。

【請求項 4】

該ヒトSSAOの可溶性形態が配列番号2のアミノ酸29ないし763を含む、請求項2
の核酸。

【請求項 5】

該融合タンパク質がヒトSSAOの膜横断部分を欠く、請求項1の核酸。

【請求項 6】

該融合タンパク質が配列番号2のアミノ酸6ないし26を欠く、請求項1の核酸。 20

【請求項 7】

該融合パートナーがヒトSSAOの可溶性形態のN末端部分に融合されている、請求項1
の核酸。

【請求項 8】

該融合パートナーがグルタチオンSトランスフェラーゼまたはその機能的に同等の変異体
である、請求項1の核酸。

【請求項 9】

該融合パートナーがSchistosoma japonicumグルタチオンSトランスフェラーゼの変異体
であって、該変異体は他のアミノ酸残基によって置換された85、138および178位
の少なくとも1つのシステイン残基を有する、請求項8の核酸。 30

【請求項 10】

該融合パートナーが配列番号4または配列番号5のアミノ酸配列を含む、請求項8の核酸
。

【請求項 11】

該シグナルペプチドがマウスIgG1重鎖シグナルペプチドである、請求項1の核酸。

【請求項 12】

該プロテアーゼ切断部位が3Cプロテアーゼ切断部位である、請求項1の核酸。

【請求項 13】

該3Cプロテアーゼ切断部位が、アミノ酸配列EALFQG(配列番号6)を含む、請求
項12の核酸。 40

【請求項 14】

該融合タンパク質が配列番号20のアミノ酸配列を含む、請求項1の核酸。

【請求項 15】

請求項1の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 16】

請求項14の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 17】

組換えヒトSSAOの精製のための方法であって、

(i) 請求項15の発現ベクターで細胞をトランスフェクトすること、 50

(i i) 培養培地中で、かつ該発現ベクターによってコードされた融合タンパク質が、該培養培地中に分泌される条件下で培養すること、

(i i i) 分泌された融合タンパク質を、融合パートナーに対してのアフィニティを有するリガンドに結合させること、

(i v) 該融合パートナーおよびヒト S S A O の可溶性形態を分離すること、および
(v) ヒト S S A O の可溶性形態を回収すること

を含む方法。

【請求項 18】

融合パートナーに対してのアフィニティを有するリガンドがグルタチオンまたはその誘導体である、請求項 17 の方法。 10

【請求項 19】

該融合パートナーを、プロテアーゼ切断によってヒト S S A O の可溶性形態から分離する、請求項 17 の方法。

【請求項 20】

該プロテアーゼがピコルナウイルス 3 C プロテアーゼである、請求項 19 の方法。

【請求項 21】

該プロテアーゼがライノウイルス 3 C プロテアーゼである、請求項 20 の方法。

【請求項 22】

該プロテアーゼを融合パートナーに融合させて融合プロテアーゼ得る、請求項 19 の方法。 20

【請求項 23】

該融合プロテアーゼが、ヒト S S A O の可溶性形態から、該融合プロテアーゼを該融合プロテアーゼに対してのアフィニティを有するリガンドに結合させることを含む方法によって分離される、請求項 22 の方法。

【請求項 24】

固定化された組換えヒト S S A O の製造のための方法であって、

(i) 細胞を請求項 15 の発現ベクターでトランスフェクトすること、

(i i) 該細胞を、培養培地中で、かつ該発現ベクターによってコードされる融合タンパク質を該培養培地中へ分泌させる条件下で培養すること、

(i i i) 該分泌された融合タンパク質を、融合パートナーに対してのアフィニティを有するリガンドへ結合させ、これによって該融合タンパク質を固定化すること、
を含む方法。 30

【請求項 25】

請求項 1 の核酸によってコードされる融合タンパク質。

【請求項 26】

該融合タンパク質が、該融合パートナーに対してのアフィニティを有するリガンド上に固定化される、請求項 25 の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ヒトセミカルバジド感受性アミンオキシダーゼ (S S A O) の可溶性形態、分泌可能融合パートナー、シグナルペプチドおよびプロテアーゼ切断部位を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む組換え体構築物に関する。本発明はヒト S S A O の可溶性形態の精製のための方法であって、当該組換え体構築物を利用する当該方法にも関する。 40

【0002】

背景技術

セミカルバジド感受性アミンオキシダーゼ (S S A O) は、酵素の銅含有アミンオキシダーゼファミリーに属し (CuAO ; EC . 1 . 4 . 3 . 6) 、そして真核および原核生物の両方に広く分布する (Buffoni, 1993) 。この豊富な酵素の生理学的役割は、本質的に未知で、そして高アフィニティの内生基質はこれまで同定されず、しかしへンジルアミン 50

は、人工的な高アフィニティ基質である (Buffoni, 1993; Callingham et al., 1995; Lyles, 1996, Hartmann and McIntire, 1997; Holt et al., 1998)。ヒトにおいて高SSAO活性は、血管平滑筋細胞に見出される (Lewinsohn 1984; Nakos and Gossrau, 1994; Yu et al., 1994; Lyles and Pino, 1998; Jaakkola et al., 1999)。SSAO活性はまた、非血管型の平滑筋細胞におよび内皮細胞に検出された (Lewinsohn, 1984; Castillo et al., 1998; Jaakkola et al., 1999)。小量のSSAOタンパク質はまた、組織結合形態と比較して類似特性を示す血液中に見出される (Yu and Zuo, 1993; Yu et al., 1994; Kurkijaervi et al., 1998)。

【0003】

多くの研究は、血漿中のSSAO活性が、いくつかのヒトの状態、例えば心不全、アテローム性動脈硬化症および糖尿病で上昇することを実証した (Lewinsohn, 1984; Boomsma et al., 1997; Ekblom, 1998; Boomsma et al., 1999; Meszaros et al., 1999)。酵素活性のこれらの変化に横たわる機構は、現在特徴付けられていない。内生アミンオキシダーゼによって生産される反応性アルデヒドおよび水素ペルオキシダーゼが、心臓血管疾患の進行の原因となりまたは寄与し得ること、および糖尿病におけるSSAO活性の阻害が血管合併症を減少させ得ることを示唆した (Ekblom, 1998)。

【0004】

最近、ヒトSSAOのcDNA配列が (Zhang and McIntire, 1996)、血管接着タンパク質1 (VAP-1) であってリンパ細胞の、末梢リンパ節血管内皮細胞への結合を仲介することによってリンパ細胞再循環を知覚する (Smith et al., 1998; またWO98/53049参照) ものと同一であることが見出された。SSAO/VAP-1のcDNA配列は、受託番号U39447およびNM_003734で寄託されている (配列番号1)。VAP-1はまた、炎症性条件下で内皮細胞表面上で上方調節されることが見出された (Smith et al., 1998)。しかし、SSAOの接着特性は、内皮細胞でのみ見出されたのみである。平滑筋細胞において、SSAOはリンパ細胞の結合を支持しない (Jaakkola et al., 1999)。DNA配列分析、構造モデル化および実験データは、ヒトSSAOが、単一N末端膜横断(spanning)ドメインによって原形質膜にアンカー付けられている2つの90-100kDaサブユニットからなるホモダイマー性糖タンパク質であることを示唆する (Morris et al., 1997; Smith et al., 1998; Salminen et al., 1998)。

【0005】

組換え体哺乳動物SSAOの精製、または天然起源からの、ほとんど均質の多量のヒトSSAOへの精製についてこれまで何ら報告は刊行されていない。1つの報告は、検出目的のための完全長ヒトSSAOのN末端へ融合されたFLAGペプチドの使用は記載したが、しかしヒトSSAOタンパク質の精製のためのその使用についての結果を提示されなかった (Smith et al., 1998)。モノクローナル抗体を使用して、小量のヒトSSAOを、イムノプロティングのために、血清および組織ホモジネートからイムノアフィニティ法で精製された (Smith et al., 1998; Kurkijaervi et al., 1998)。結果的に、有意な量のヒトSSAOの精製のための代替的方法の必要性がある。

【0006】

*Schistosoma japonicum*由來のグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) は、ホモダイマー細胞質性酵素であって、固定化コファクターグルタチオンを使用するアフィニティクロマトグラフィー、次いで還元性グルタチオン (GSH) を使用する競合的溶出によって精製できるものである。この特異的相互作用の利益によって、*E. coli*細胞内発現のための遺伝子融合系が、Smithおよび共同研究者によって開発され (Smith & Johnson, 1998、またWO88/09372参照)、GSTへ融合された組換え体タンパク質の検出および精製を容易化した。融合体パートナーとしてGSTを使用することにともなう潜在的な欠点は、その表面上の遊離システインが、酸化的環境に曝露されたときに例えれば融合される標的タンパク質上の遊離システインと架橋し得る可能性である。このリスクを最小化するため、そしてGST融合タンパク質の分泌を可能とするため、GSTの突然変異体形態が最近開発され、これはホモダイマーを形成する能力および酵素活性の両方を保持する (T

10

20

30

40

50

udyka and Skerra, 1997)。GSTのホモダイマー化傾向を使用し、増加されたアビジチー効果のために、融合される標的タンパク質のダイマー化を喚起することができる(Tudyka and Skerra, 1997)。

【0007】

文献に記載された代替的ホモダイマー性融合パートナーは、例えば免疫グロブリンのFc領域(Hollenbaugh et al., 1992; Sakurai et al., 1998; Lo et al., 1998; Dwyer et al., 1999)およびロイシンジッパー、例えばGCN4(Rieker and Hu, 2000; Mueller et al., 2000)である。いくつかの種々のタンパク質が、種々の目的のため、例えばアビジチーを増加させるため(Dwyer et al., 1999; Muller et al., 2000)および途切れたDNA結合タンパク質の高アフィニティDNA結合を回復するために(Rieker and Hu, 2000)これらのホモダイマー性タンパク質ドメインに融合された。Fc融合タンパク質は、低pHバッファーによる溶出に関するタンパク質Aアフィニティクロマトグラフィーによって精製でき(Sakurai et al., 1998; Lo et al., 1998)、これは融合された標的タンパク質の活性を減少させ得る(Graeslund et al., 1997)。融合パートナーとしてFcを使用することに随伴するさらなる問題は、細胞生長のための血清の使用であって、これは分泌されたFc融合物の検出および精製を複雑にし、なぜなら血清は多量の免疫グロブリンを含むからである(Sakurai et al., 1998)。ロイシンジッパーGCN4は、E. coliにおいて発現されるタンパク質の融合パートナーとしてほとんど使用され(Mueller et al., 2000)、そしてアフィニティタグを融合し、精製を容易化しなければならない。

【0008】

図面の簡単な説明

図1は、GST-SSAO-DNA構築物の概略図である。GST融合パートナーにおける3つのシステインからセリンへの突然変異(GenBank受託番号M14654を有する配列による残基85、138および178)は、太字で示される。ボックスを付した配列は、3Cプロテアーゼの認識配列を示す。

図2は、SSAO精製プロセスの概観である。それぞれの精製工程について決定された特異的活性を示す。

図3は、pMB887と命名されたGST-SSAO発現ベクターの該略図である。

【0009】

発明の開示

本発明にしたがって、予測できないことに、可溶性ヒトSSAOが、可溶性SSAOのダイマー化を可能とすることのできる融合パートナーを利用する精製系において、ミリグラム量で生産することができることが見出された。結果的に、第一側面では、本発明は融合タンパク質であって

(i)ヒトSSAOの可溶性形態、

(ii)SSAOのダイマー化を可能とする分泌可能融合パートナー、

(iii)宿主細胞からのポリペプチドの、培養培地への分泌を可能とするシグナルペプチド、および

(iv)ヒトSSAO変異体および融合パートナーの間に位置するプロテアーゼ切断部位を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む組換え体構築物を提供する。

【0010】

当業者に理解されるように、該組換え体構築物は所望により種々の長さのスペーサーアミノ酸配列をコードする1または2以上のヌクレオチド配列を含むことができる。そのようなスペーサー配列を使用し、融合タンパク質内のフレキシビリティーを増加させ、またはタンパク質ドメイン間のスペースを増加させ、その結果、隣接ドメインと独立に折り畳みが起こることができる。さらに、スペーサーは、導入された切断可能認識配列で切断するプロテアーゼの接近可能性を増加させるために有用であり得る。

【0011】

ヒトSSAOの可溶性形態は、好ましくは、野生型ヒトSSAOの膜横断部分を欠く。SSAOポリペプチドの膜横断部分は、当業界で知られ(Morris et al., 1997; Holt et a 50

I., 1998; Smith et al., 1998)、そして配列番号2のアミノ酸5ないし27、特にアミノ酸6ないし26に本質的に示す。

【0012】

ヒトSSAOのアミノ酸配列は、膜横断部分を除き、配列番号2の29位ないし763位を好ましくは含み、または本質的にそれからなる。しかし、当業者は、膜横断部分の一部が該SSAOポリペプチドを、該ポリペプチドがなおもその本質的に可溶性の特性を維持しつつ、含み得ることを理解する。結果的に、ヒトSSAOのアミノ酸配列は、配列番号2の例えは27ないし763位、または28ないし763位を含み、ヒトSSAOの生物学的活性を実質的に有するそれらのフラグメントを含む。さらに、用語「ヒトSSAOポリペプチド」は、酵素的活性またはタンパク質相互作用（例えは接着機能）を保持した、または構造的研究を容易化するように設計された（例えは結晶化について改善された特性）、または構造／機能関連性の研究を容易化するように突然変異させた（これはまた不活性突然変異体を含む）、ヒトSSAOの突然変異体および天然に存在する変異体を含むことを意図する。

10

【0013】

該融合パートナーを、ヒトSSAOポリペプチドのC末端またはN末端部分に融合することができる。該融合タンパク質は1より多い融合パートナー、例えはSSAOの、N末端に融合するもの、およびC末端に融合するものを含み得ることを認識する。追加的融合パートナーは、追加的アフィニティタグ、またはレポータータンパク質、例えは増強緑色蛍光タンパク質（EGFP）であり得る。

20

【0014】

多数の種々の遺伝子融合システムおよび融合パートナーが記載された。そのようなシステムでは、相互作用の種々の型、例えは酵素・基質、細菌レセプター・血清タンパク質、ポリヒスチジン・金属イオン、および抗体・抗原が利用された（Uhlen et al., 1992）。アフィニティ精製のための種々の遺伝子融合システムは、当業界で知られる。そのようなシステムで使用される融合パートナーの例は（概説のために、例えはNilsson et al., 1997; またはSheibani, 1999）、スタフィロコッカスプロテインAおよびその誘導体Z；スタフィロコッカス性プロテインA由来のアルブミン結合タンパク質；グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）；ポリヒスチジンタグ；ビオチニル化アフィニティタグ（例えはBiotin Avi Tag）；E. coliマルトース結合タンパク質；セルロース結合ドメイン；FLAGペプチド；およびStrep-タグを含む。代替的なシステムは、新規リガンドレセプターの生成のため、タンパク質骨格を使用して改変し得る（Skerra, 2000およびそこの引用参照）。これらの新規結合タンパク質、例えはアフィボディはそして、種々の応用のための融合パートナーとして有用であり得る（Nygren and Uhlen, 1997; Nord et al., 1997）。

30

【0015】

本発明にしたがって、当該融合パートナーは、SSAOのダイマー化を可能とするものとする。好適な融合パートナーは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）であり、なぜならそのダイマー化する傾向のためであり、および精製処理が、固定化グルタチオン（例えはAmersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）を含むクロマトグラフィー媒体を使用する温和な条件下で実施される可能性があるからである。加えて、GSTはその酵素活性によってまたはGST特異的抗体またはグルタチオンの使用によって、商業的に利用可能なGST検出システム（例えはAmersham Pharmacia Biotech）を使用して、簡便には検出することができる。該融合パートナーはまた、ダイマー化の保持された傾向を有する、かつアフィニティ精製を可能とする結合特性を有する、GSTの機能的に同等な変異体であり得る。当該融合パートナーは、より好ましくは、S. japonicum GST（GenBank受託番号M14654；配列番号3および4）の変異体であって、宿主細胞からの分泌のために設計され、85、138および178位の、1または2以上の、そのシステイン残基が他のアミノ酸残基（複数もある）で置換されたものである。最も好ましくは、当該変異体は、85、138および178位のシステイン残基の全てがセリン残基で置換され

40

50

たものである (Tudyka & Skerra, 1997および配列番号 5 参照)。

【0016】

加えて、当該組換え体構築物は、当該融合タンパク質の、宿主細胞から培養培地への分泌を可能とするN末端シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むものとする。真核細胞におけるヒトタンパク質、例えばSSAOの生産のために、ホモロガスシグナルペプチドが好ましい。HEK293細胞におけるSSAO生産のために、例えばマウスIgG1重鎖シグナルペプチド (Kabat et al., 1991) を使用し得る。他の好適なシグナルペプチドが当業界で知られ、そして例えば前掲のKabat et alに記載される。

【0017】

幾つかの方法は、化学的物質、例えばCNBrまたはヒドロキシルアミン、または酵素例えばエンテロキナーゼ、Xa因子、トロンビン、ズブチリシンまたは他のプロテアーゼ(例えばNilsson et al. (1997)およびその引用参照)での処理に基づく融合タンパク質の部位特異的切断のため記載された。本発明にしたがって、当該融合パートナーは、簡便には、プロテアーゼ切断によってヒトSSAOから除去することができる。切断のために使用すべきプロテアーゼは例えば、ピコルナウイルス科由来の3Cプロテアーゼ、例えばライノウイルスまたはエンテロウイルス3Cプロテアーゼ (Walker et al., 1994) であることができる。結果的に、好ましくはプロテアーゼ切断部位は、ピコルナウイルス科由来の3Cプロテアーゼ、例えばライノウイルスまたはエンテロウイルス3Cプロテアーゼのための切断部位であることができる。本発明の1つの例示的形態では、当該3Cプロテアーゼ切断部位は、アミノ酸配列EALFQG(配列番号6)を含む。しかし、当業者は、他の好適な切断部位を同定することができ、例えばBiom et al. (1996)およびその引用参照。

【0018】

本発明にしたがう組換え体構築物は、例えば図1に示すアミノ酸配列を本質的にコードするヌクレオチド配列を含む。本発明はまた、本発明に従う組換え体構築物を含む、標準的方法にしたがって調製した発現ベクターを提供する。そのような発現ベクターは、pMB887と呼ばれる発現ベクターによって例示され、図3に示す。

【0019】

さらなる側面では、本発明は、組換え体ヒトSSAOポリペプチドの精製の方法であって、(i)前に定義したように、本発明の発現ベクターで細胞をトランスフェクトすること、(ii)当該細胞を、ベクターによって発現される融合タンパク質が細胞培地へ分泌されることを可能とする条件下で培養すること、(iii)得られた融合タンパク質を、該融合パートナーに対してアフィニティを有するリガンドを含む培地へ結合させること、(iv)当該融合パートナーおよび該SSAOポリペプチドを分離すること、および(v)精製したヒトSSAOポリペプチドを回収することの工程を含む方法を提供する。

【0020】

該融合パートナーは、融合タンパク質がなおアフィニティリガンドに付着されているとき、または該融合タンパク質が該アフィニティリガンドから開放されたときのいずれかのとき、ヒトSSAO変異体から分離することができる。当該融合パートナーが、GSTである場合、該融合パートナーに対してのアフィニティを有する当該リガンドは好ましくは、グルタチオンまたはその誘導体である。あるいは、GST抗原処理された抗体をアフィニティリガンドとして使用し得る。

【0021】

前記の様に、該融合パートナーを、例えばピコルナウイルス、例えばライノウイルス、3Cプロテアーゼでのプロテアーゼ切断によってヒトSSAOから分離することができる。当該プロテアーゼを、融合パートナーに融合し、それによって「融合プロテアーゼ」を得ることができる (Walker et al., 1994; Graeslund et al., 1997)。そのような融合パートナーは簡便には、SSAOポリペプチドのために使用したのと同じ融合パートナー、

例えばグルタチオンSトランスフェラーゼであることができる。しかし、プロテアーゼのための他の好適な融合パートナー、例えばストレプトコッカス性プロテインG由来のアルブミン結合タンパク質は、当業界に既知であり、例えばGraeslund et al., 1997参照。当該融合プロテアーゼを、該融合プロテアーゼを当該融合パートナーに対するアフィニティを有するリガンドを含む培地へ結合することを含む方法によって分離することができる。結果的に、該融合パートナーはGSTであるとき、当該リガンドは好ましくはグルタチオン、またはその誘導体である。前記の様に、該融合パートナーに指向された抗体はまた、アフィニティリガンドとして使用し得る。商業的に利用可能なシステムは、PreScission Protease(Amersham Pharmacia Biotech,)であり、これはS. japonicum GSTおよびヒトライノウイルス3Cプロテアーゼからなる遺伝的に改変された融合タンパク質である。

10

【0022】

ある種の適用のために、SSAOを固定化するのが有利であり得る。これは、例えばアフィニティタグ、たとえば前記のようなGSTによって達成し得る。融合タンパク質がアフィニティタグを介して固定化される場合の適用の例は、タンパク質リガンドの捕捉、タンパク質-タンパク質相互作用の分析、およびバイオリアクターにおける使用を含む(Nilsson et al., 1996; Nord et al., 1997; Shpigel et al., 1999)。しかし、タンパク質の固定化のための多くの代替的方法が記載され(例えばTischer and Kasche, 1999およびそこの引用参照)、それはまた、融合パートナーの除去後GST-SSAOまたはSSAOの固定化、例えば共有結合および非共有吸着のために適用可能であり得る。加えて、SSAOタンパク質はまた、ゾル-ゲルまたは人工的細胞、例えばリポソームにカプセル化し得る(例えばLiang et al., 2000およびそこの引用参照)。

20

【0023】

アフィニティタグ、たとえばGSTによる一つの利益は、例えば細胞ライセートから直接的に、しばしば1工程処理によって、指向化固定化を達成できることである。これは、活性結合部位のよい空間的配置接近可能であることおよび安定性の増加と言う結果となり得る(Saleemuddin, 1999; Turkova, 1999)。タンパク質の固定化のために使用されてきた代替的なアフィニティタグのアプローチの1例は、例えば、ビオチンリガーゼによって特異的にビオチニル化され、そしてビオチンおよびストレプトアビジンまたはアビジンの間の非常に強い相互作用($K_d \sim 10^{-15}$)を利用する融合パートナーとして使用できるペプチドおよびタンパク質(Nilsson et al., 1997)、および特異的にセルロースに結合するCBDである(Linder et al., 1998; Tomme et al., 1998)。タンパク質の指向化固定化はまた、タンパク質を結合する固定化された抗体を使用することによって、またはタンパク質表面上に存在し得る炭水化物部分を介して達成し得る(Turkova, 1999)。

30

【0024】

最近、エンドウ実生からのアミンオキシダーゼが、修飾されたカーボンペーストを使用して固定化され、生物発生性および合成アミンの定量のためのバイオセンサーを得られた(Wimmerova and Macholan, 1999)。同様に、組換え体ヒトSSAOを、バイオセンサーの構成のために固定化し、例えば、産業的有機性工程において使用され、そしてSSAOのための基質である、心臓血管毒素アリルアミンを検出し得る(Boor and Hysmith, 1987; Conklin et al., 1998)。固定化された場合、組換え体SSAOは、膜アンカー型であるSSAOおよび、可溶性状態と異なり得るその特性を模倣し得ることを想起し得る。

40

【0025】

結果的に、以下の例に示されるように、本発明は、酵素的活性を伴う高度に精製された可溶性組換え体ヒトSSAOの生産のための手法を提供する。例示された手法は、アフィニティ融合パートナーとして、宿主細胞からの輸送のために設計された(Tudyka and Skerra, 1997)、S. japonicumグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)からの突然変異体の使用に関係する。融合タンパク質を、哺乳動物細胞から分泌させ、そしてグルタチオン-アフィニティクロマトグラフィーによって培養培地から直接的に精製し得る。特異的タンパク質分解および追加的グルタチオン-アフィニティクロマトグラフィー工程によって、該融合パートナーおよびプロテアーゼを除去し、それによって純粋な、可溶性且つ高

50

度に活性の組み換え体ヒトSSAOタンパク質を、ミリグラム量で得た。発明者らの知識では、ヒトSSAOタンパク質の可溶性形態の、活性の組換え体が生産され、そしてほとんど均質に精製されたのはこれが最初である。

【0026】

組換え体ヒトSSAOの生産のために開示された方法は、他の哺乳動物アミンオキシダーゼ、例えばヒト胎盤アミンオキシダーゼ(Zhang et al., 1995)およびヒト網膜特異的アミンオキシダーゼ(Imamura et al., 1998)、並びに他の分泌可能タンパク質にまた適用可能であることと信じる。開示の方法はまた、修飾の発見および同定、例えば活性部位コファクターの同定を、例えばコファクターを含有するペプチドの単離によって、または結晶構造決定によって容易化し得る。

10

【0027】

以下の例において、SSAOが活性かつ可溶性で、膜貫通(transmembrane)領域を欠くこと、およびGSTをタンパク質分解的に除去することができる事が示された。これらの発見は、SSAOが膜貫通領域付近でのタンパク質分解性切断によって循環中に放出される(shedding)仮説である、I型およびII型膜タンパク質について一般的であるプロセスを支持する。例えば糖尿病において血漿中、上昇したSSAO活性(Boomsma et al., 1999)はこうして、膜アンカー型であるSSAOを切断するプロテアーゼの増加したタンパク質分解活性の、または存在するプロテアーゼのための基質利用可能性を増加させる表面局在化の増加の結果であり得る。

20

【0028】

特に定義しない限り、ここで使用するすべての技術的および具体的用語は、本発明の属する当業界での通常の技術を有する者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。好適な方法および材料は以下に記載するが、ここに記載のものと類似または同等の方法および材料はまた、本発明の実施化または試験において使用できる。すべての刊行物、特許出願、特許およびここに言及する他の引用は、引用によりその全体をここに含める。矛盾がある場合には、定義も含めて本明細書の記載が優先する。加えて、材料、方法および例は、例示のみであり限定することを意図しない。本発明の他の特徴および有利性は、以下の詳細な記載および特許請求の範囲から明かとなるであろう。

30

【0029】

実験方法

大動脈cDNAからのヒトSSAO遺伝子のPCR增幅およびクローニング

2種のPCRプライマーを、ヒト胎盤アミンオキシダーゼの公開されたcDNA配列(GenBank受託番号U39447; Zhang and McIntire, 1996)の助けによって設計した。5'プライマー-XNQZ-15(5'CCG GAA TTC CAA CGC GTC CAT GAA CCA GAA GAC A AT CCT CGT G 3'、配列番号7)を、ATG開始コドンを含むSSAOコード配列の5'末端にハイブリダイズし、かつクローニングのための制限酵素切断部位EcoRIとmLuIを含むように設計した。3'プライマー-XNQZ-17(5'CCC CCA AGC TTG TCG ACT CAC TAG TTG TGA GAG AGA AGC CCC CCC 3'、配列番号8)を、本来の停止コドンTAG次いで追加的な停止コドントGAおよび、クローニングのための2つの制限酵素切断部位であるSalIおよび HindIIIを含む、3'末端にハイブリダイズするように設計した。PCRのためのテンプレートとして、0.5μlのヒト大動脈およびヒト平滑筋細胞QUICK-Clone cDNA(1ng/μl、Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)を試験した。以下の条件すなわち50μlの総体積中、20pmolのそれぞれのプライマー-XNQX-15およびXNOZ-17、1μlのdNTP類(10mM)、1μlのAdvantage cDNA cDNA Polymerase Mix(Clontech)、5μlの10×cDNA PCR反応バッファー(Clontech)をPCR反応のために使用した。増幅をPerkin-Elmer 2400サーモサイクラー(Perkin-Elmer, Norwalk, CT)で実施した。PCRプログラムは、94 5分間の当初変性、94 30秒間、60 30秒間および72 3分間の35サイクル、次いで72 3分間での最終伸長からなる。TAクローニングを次いで使用し、該PCR産物をベクターPCR2.1-TOPO(Invitrogen, Carlsbad, CA)に挿入した。クローニングし

40

50

た P C R フラグメントを、色素ターミネーターサイクル配列決定についての標準的プロトコルにしたがって両方の方向で配列決定し、そして D N A 配列決定機 A M I 3 7 7 (Applied Biosystems, Foster City, CA)で分析した。

【 0 0 3 0 】

哺乳動物細胞における S S A O の発現のためのベクターの構築

完全な S S A O タンパク質の哺乳動物細胞における発現のためのベクターを、 p C R 2 . 1 T O P O - S S A O ベクターからの E c o R I および S a l I フラグメントの、ベクター - p C I - n e o (Promega, Madison, WI) への挿入によって調製し、ベクター p M B 8 4 3 を得た。このベクターを、ヒト S S A O の残基 2 9 - 7 6 3 に対応する領域の P C R 増幅のためのテンプレートとして使用した (Zhang and McIntire, 1996) 。 5 ' プライマ - 5 ' GAG GAA GCT TTG TTC CAA GGT GGA GAT GGG GGT GAA 3 ' (配列番号 9) を、 3 C プロテアーゼ切断部位 (以下参照) の一部についてのコドンおよび残基 2 9 についてのコドンの上流の H i n d I I I 制限酵素切断部位を含むように合成した。 3 ' プライマ - 5 ' GCA TTC TAG TTG TGG TTT GTC 3 ' (配列番号 1 0) は、クローニングした S S A O フラグメントの下流にアニーリングする p C I - n e o ベクター特異的プライマーである。得られた P C R 産物を、 H i n d I I I および N o t I で消化しそしてプラスミド p E T 3 8 b (+) (Novagen, Inc., Madison, WI) にクローニングし、同じ酵素で切断し、 p E T 3 8 - S S A O を得た。 D N A 配列決定を、前記の様に実施し、クローニングした S S A O フラグメントの予測された配列を確認した。

【 0 0 3 1 】

組換え体タンパク質のための分泌可能な酵素的に活性のダイマー化モジュールとして以前使用した S. japonicum からのグルタチオン S トランスフェラーゼ (G S T) の突然変異形態 (配列番号 5) (Tudyka and Skerra, 1997) を、 P C R 仲介突然変異誘発、そして以下に記載のようにフラグメントのアセンブリによって調製した。突然変異を実施し、 S. japonicum GST (Lim et al., 1994; Tudyka and Sierra, 1997) の結晶構造中に表されたような G S T タンパク質表面付近に位置する 3 つのシステイン残基 8 5 、 1 3 8 および 1 7 8 をセリン残基で置換し、酸化的環境への G S T 融合タンパク質の輸送後の、望ましくないジスルフィド形成を回避した (Tudyka and Skerra, 1997) 。以下の P C R プライマーを使用し、突然変異 G S T を構築し、 3 C プロテアーゼ切断部位の第一の部分 (以下参照) 並びにクローニングのための好適な制限酵素切断部位を導入した。加えて、該プライマーは、コントロール切断のため、およびライゲーションによって P C R フラグメントをアセンブルする可能性のため、内部制限部位を導入する : R O E L - 1 (5 ' GCC GGA AT T C G A C G C G T C C C T A T A C T A G G T T A T T G G 3 ' ; 配列番号 1 1) は、クローニングのための E c o R I および M 1 u I を含み、そして G S T (M 1 4 6 5 4) のコドン 2 - 8 にアニーリングする ; R O E L - 2 (5 ' C T C T G C G C G C T C T T T T G G A G A A C C C A A C A T G T T G T G C 3 ' ; 配列番号 1 2) は、 B s s H I I 部位を含む ; R O E L - 3 (5 ' G G T T C T C C A A A A G A G C G C G A G A T T T C A A T G C T T G A A G 3 ' ; 配列番号 1 3) は、 B s s H I I 部位を含む ; R O E L - 4 (5 ' A T G A G A T A A C C G G T C T T C G A A C A T T T C A G C A T T C 3 ' ; 配列番号 1 4) は、 B b s I 部位を含む ; R O E L - 5 (5 ' G T T C G A A G A C C G T T T A C T T C A A T A A C A T T T A A A T G G T G A T C 3 ' ; 配列番号 1 5) は、 B b s I 部位を含む ; R O E L - 6 (5 ' A A A A G A A A C T A G T T T T G G G A A C G C A T C C A G G C A 3 ' ; 配列番号 1 6) は、 S p e I 部位を含む ; R O E L - 7 (5 ' C C C A A A A C T A G T T C T T T A A A A C G T A T T G A A G C T A T C 3 ' ; 配列番号 1 7) は、 S p e I 部位を含む ; R O E L - 8 (5 ' A C C C A A G C T T C C T G A C T T T G T G A C T T T G G A G G A T G G T C G C C A C C 3 ' ; 配列番号 1 8) は、クローニングのための H i n d I I I を含み G S T (M 1 4 6 5 4) のコドン 2 1 2 - 2 1 8 にアニールする。 R O E L - 8 はまた、部分的 3 C プロテアーゼ切断部位の前にスペーサー - 配列 S Q S Q のためのコドンを導入するであろう。 G S T 遺伝子のオーバーラッピング部分を別個の P C R 反応で、プライマー対 R O E L - 1 / 2 、 R O E L - 3 / 4 、 R O E L - 4 / 5 および R O E L - 7 / 8 で、プラスミド p G E X - 6 P - 2 (Amersham Pharmacia Biotech) をテンプレートとして使用して増

10

20

30

40

50

幅する。これにより、完全な突然変異GST遺伝子を得、これら4種のPCRフラグメントを混合すること、およびこれらをテンプレートとして、プライマーROEL-1およびROEL-8でのPCR反応において使用することによってアセンブルした。該PCR反応を、Advantage cDNA PCR Kit(Clontech)を使用して実施した。次の工程では、GSTフラグメントをRcoRIおよびHindIIIで消化し、そしてpUC18(Amersham Pharmacia Biotech)の同じ部位にクローニングし、pMB809を得た。DNA配列決定を、前記の様に実施し、突然変異GSTフラグメントの予測された配列を確認した。pMB809ベクターを、EcoRIおよびHindIIIで切断し、そしてGSTフラグメントを単離し、そして同じ酵素で切断されたpET38-SSAOベクター中のSSAOフラグメントの上流にクローニングした。この工程により、GSTとSSAOの間の(残基29-763)ヒトライノウイルス14およびコクサッキーウィルス(Miyashita et al., 1996; Wang et al., 1997)の、完全な3Cプロテアーゼ切断部位EALFQG(配列番号6)の創出と言う結果となった(図1参照)。

10

20

30

40

50

【0032】

GST-SSAOフラグメントを、ベクターpMB565のMluIとSalI部位にクローニングし、ここにマウスIgG重鎖の突然変異シグナル配列(図1)を、哺乳動物発現ベクターpCI-neo(Promega)の多重リンカー中にクローニングする。得られたGST-SSAO発現ベクターを、pMB887と命名する(図3)。

【0033】

安定クローンのトランスフェクションおよび選択

3種の 25 cm^2 Tフラスコに約 4×10^5 ヒト胚腎臓293細胞(HEK293細胞、ATCCRL-1573, Rockville, MD)を播種した。細胞を、10%の胎児ウシ血清(FBS)および2mMのL-グルタミンを補足したDulbeccoの修飾イーグル培地(DMEM)を含む増殖培地で50%までコフルエントに増殖させた。このFBSを56-30分間熱不活性化し次いで、増殖培地成分と混合した。発現ベクターpMB887を次いで、製造者の推奨にしたがってLipofectAMINEを使用して(Life Technologies, Frederick, MD)リポソーム仲介トランスフェクションによって細胞に導入した。48時間の増殖後、安定的にトランスフェクトした細胞の選択のために、培地を1mg/mlのジェネチシン(G418)で補足した増殖培地に、全てのフラスコで培地を交換した。約2週間後、抵抗性細胞が出現し、そしてコフルエントに増殖させた。3つのTフラスコからの細胞をプールし(クローンの混合物)、そして1.2mg/mlのG418を補足した増殖培地中に希釈し、そして15cmペトリ皿に播種した。個別のコロニーが2週間後に出現し、そしてGST-SSAO生産の次の分析のために個別に拡張させるべくつまみ出した。拡張したクローンからの、収集した培地中のGSTタンパク質の検出を、GST96ウェル検出モジュール(Amersham Pharmacia Biotech)を使用して実施した。7この陽性クローンを選択および凍結した。

【0034】

Cell Factory中のGST-SSAOの生産

クローン番号10を拡張させ、そして5%FBS(熱不活性化)、2mMのLグルタミンおよび1.2mg/mlのG418を補足したDMEMを含む増殖培地中で培養し、そして使用して、1500mlの増殖培地を含む 6320 cm^2 のNunc Cell Factory(Nalge Nunc Int., Naperville, IL)に播種し、37で増殖させた。4日の増殖後、細胞はコフルエントになり、そして培地を収集した。新しい増殖培地(1500ml)と減少した量のFBS(2%)を次いで、同じCell Factory中の細胞に添加し、次いで3日後に調質した培地を収集した。この処理を1回反復し、1つのCell Factoryから4.5リットルまでの総量の収集した培地を得た。収集した培地を遠心分離しそして-70で貯蔵した。

【0035】

調質した細胞培地の濃縮

2つのCell Factory(9.4リットル)からの凍結した調質した培地を、30のウォーターパス中で融解した。材料を、Centramate超ろ過装置(Pall Filtron, Northborough, M

A) を使用して、Omega膜 (MWCO(Molecular-Weight Cut-Off)10000)を経由してポンプし、600mlの体積を達成した。濃縮水を0.65μmのプレフィルター (Sartorius, Goettingen, Germany)を備えた、0.45μmフィルターであるSartobran Pを経由してろ過した。管系中の残りの濾液を、250mlのリン酸緩衝食水 (PBS)によって置換し、850mlのろ過サンプルを得た。

【0036】

GST-SSAOの精製および切断

GST-SSAO融合タンパク質を、10カラム体積のPBSで平衡させた、8mlのグルタチオン-セファロース4Fast Flow (10mgまでのGST/m1ゲルを結合する、Amersham Pharmacia Biotech)を充填したHR10/10カラム (Amersham Pharmacia Biotech)においてグルタチオニアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。ろ過した材料 (850ml)を、室温で終夜0.9ml/分で負荷した。フロースルーマテリアルを、分析のために収集し、そして-20で貯蔵した。PBSでカラムを洗浄後、結合したタンパク質を溶出緩衝液で溶出させた (20mMのGSH、0.1MのNaCl、0.1MのTris-HCl、pH8.2)。

【0037】

溶出液をヘリウムを散布した切断可能緩衝液 (150mMのNaCl、1mMのEDTA、50mMのTris-HCl、pH7.5、25)で平衡させたHiPrep Desalt 26/10カラム (Amersham Pharmacia Biotech)に負荷し、そしてタンパク質ピークを収集した。切断を、DTT (ジチオスレイトール)を5mMまでおよび380単位のPreScissionプロテアーゼ (Amersham Pharmacia Biotech)を添加することによって開始させた。PreScission ProteaseはGSTおよびヒトライノウイルス3Cプロテアーゼからなる遺伝的に改変された融合タンパク質であり、そしてその認識配列のGln(Q)およびGly(G)残基の間を特異的に切断する。

【0038】

該切断混合物を、5でインキュベートした。63時間のインキュベーション後、この材料を、切断緩衝液で平衡させたグルタチオン-セファロースカラムに前記の様に負荷した。貫流液 (36ml)を収集し、そして5で約1週間開管中で貯蔵した。サンプルをとりだし、そしてSDS-PAGE (非還元性)によって分析した。カラムに捕捉したタンパク質を、分析のために溶出緩衝液で溶出させた。収集したタンパク質サンプルを、緩衝液交換および濃縮のために、JumboSep装置 (MWCO 30000, Pall Filtron)に適用した。遠心分離および50mMのTris-HCl (pH7.5)および150mMのNaClを含む緩衝液での希釈の5サイクルを実施した。サンプルを種々の分析のためにとった。緩衝液交換および濃縮された材料 (4.2ml)を次いで、-70で貯蔵した。

【0039】

タンパク質分析

SSAOの精製およびサイズを、SDS-PAGEによって分析した。サンプルを、勾配性ゲル4-20%または4-12% (Novex, Copenhagen, Denmark)において、2-メルカプトエタノールの存在下または不存在下で電気泳動し、そしてタンパク質をクマシ染色 (PhastGel Blue R, Amersham Pharmacia Biotech)によって可視化した。タンパク質濃度を、製造者の指示にしたがって、標準としてウシ血清アルブミンにより、96ウェルプレートにおけるCoomassie Plus proteinアッセイ試薬キット (Pierce, Rockford, IL)で決定した。

【0040】

サイズ排除クロマトグラフィーを、SMART System (Amersham Pharmacia Biotech)を使用して、Superdex 200 PC 3.2/30カラム (Amersham Pharmacia Biotech)において実施した。カラムを、50mMのTris-HCl (pH7.5)、150mMのNaClおよび1mMのNaClおよび1mMのEDTAを含むバッファーで室温で平衡化させた。注入容量は、10μlであり、そしてサンプルを、0.1ml/分の流速で溶出させた。カラムキャリブレーション分子量マーカーのため、Gel Filtration HMW Calibration Kit (Amersha

10

20

30

40

50

m Pharmacia Bioech)からの、Blue Dextran 2000(~2000 kDa)、チログロブリン(669 kDa)、フェリチン(440 kDa)、カタラーゼ(232 kDa)およびアルドラーゼ(158 kDa)を使用した。

【0041】

N末端配列決定を、精製GST-SSAOおよびSSAOについて、HP 1090 PTH分析器(Hewlett Packard, Palo Alto, CA)に結合されたHP G1000Aタンパク質シーケンサーを使用する反復されたエドマン分解によって実施した。GST-SSAOサンプルを脱塩し、分析前にグルタチオンを除去した。SSAOを、切断後のグルタチオン・セファロースカラムのフロースルーより取得した。

【0042】

Holtおよび共同研究者(Holt et al., 1997)によって記載されたモノアミンオキシダーゼのためのスペクトロフォトメトリックアッセイを使用し、種々の精製工程からのサンプル中のアミンオキシダーゼ活性を決定した。アッセイを、SPECTRAmax 250マイクロプレートスペクトロフォトメーター(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)において37でインキュベートされた96ウェルマイクロタイタープレートで実施した。0.2のリン酸カリウムバッファー(pH 7.6)中に、1 mMのバニリン酸(Sigma, St. Louis, MO)、500 μMの4-アミノアンチピリン(Sigma)、および4 U ml⁻¹のペルオキシダーゼ(ホースラディッシュ由来のV型、Sigma)を含む試薬ミックスを調製し、同じ日にアッセイを実施し、使用まで5で保持した。反応を、50 μlのサンプル、50 μlの試薬ミックスおよび200 μlのリン酸カリウムバッファーであって750 μMのベンジルアミンヒドロクロリド(Sigma)を有するまたは有しないものを混合することによって開始させ、そして3反復で実施した。プランク参照値を取得するため、ウェルを、サンプルの代わりにバッファーを加えて分析した。吸光度の変化を、10-40分にわたり490 nmで追跡した。標準曲線を、H₂O₂のストック溶液の、10 nmol / ウェルないし120 nmol / ウェルの範囲の、リン酸カリウムバッファー中による希釈によって調製した。阻害実験を実施したとき、サンプルを、ベンジルアミン溶液の添加の前に、37で30分間300 μMのセミカルバジド中でインキュベーションした。

【0043】

発明をここで、以下の実施例を参考することで説明する。これらは発明を例示することのみ意図し、そしてとにかく発明の範囲の限定として考察すべきではない。

【0044】

実施例

実施例1：SSAO cDNAのクローニング、

PCR戦略を、ヒト大動脈由来のヒトSSAOの遺伝子を増幅するために使用した。該PCRプライマーを、ヒト胎盤アミンオキシダーゼ遺伝子に隣接する配列(Zhang and McIntire, 1996)を含ませ、かつ種々の発現ベクターへのクローニングのための制限酵素切断部位を含むよう設計した。~2300 bpのPCR生成物をクローニングし、そして引き続くDNA配列決定は、該クローニングしたPCR産物が、ヒト胎盤アミンオキシダーゼ配列(Zhang and McIntire, 1996)に、および肺cDNAからクローニングされたVAP-1配列(Smith et al., 1998)に同一であることを示した。

【0045】

実施例2；膜に結合したSSAOの精製(比較例)

組換えSSAOタンパク質を生産するための試みは、ヒトSSAPタンパク質の完全コード配列がクローンニングされているpMB843を使用して、活性SSAOがヒト肺腎臓(HEK293)細胞中で生産され得ることを示した。活性タンパク質が、可溶化剤を使用する抽出後見出されたが、マイクログラム量のみのタンパク質が部分的に精製された。

【0046】

実施例3：SSAOの可溶性形態の発現のための遺伝子構築物の理論的解釈および設計代替的な戦略を、哺乳動物細胞における非膜結合性SSAOの生産のため開発した。精製および検出を、推定膜横断ペプチドを含むN末端領域を、固有ダイマー化傾向を有するア

10

20

30

40

50

フィニティ融合パートナーで置換することによって実施した。該戦略はまた、培養培地へ該融合パートナーを分泌することができるための分泌可能アフィニティ融合パートナーの使用に関係した。S. japonicumグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)の突然変異性変異体を選択した。この突然変異体GSTは、その活性並びにダイマー化する傾向を有し、そして分泌のため最適化された(Tudyka and Skerra, 1997)。

【0047】

精製GST-SSAO融合タンパク質からのSSAOの放出を可能とするように、プロテアーゼ切断部位を設計した。予測されたアミノ酸配列のスキャンによって、3つのグリシン残基によって隣接された28位のアルギニンが明かとなった。いくつかのヒトプロテアーゼは、塩基性残基の後で切断し(Carter, 1990; Hooper et al., 1997)、およびグリシン残基の短いストレッチは、プロテアーゼへの感受性を高めることが示唆された(Carter, 1990)。加えて、多くの膜アンカータンパク質の細胞外領域の、血流へのタンパク質分解的放出(shedding)は、その膜の近くで起こる(Hooper et al., 1997)。29位のグリシン残基はしたがって、GST-SSAO融合タンパク質の精製後、部位特異的タンパク質分解のために好適な基質へ連結するように選択した。こうして、P1'位のグリシンを有する、かつ高い特異性を有する基質を切断できるプロテアーゼが望まれた。いくつかの商業的プロテアーゼは、Xa因子、トロンビン、エンテロキナーゼおよび3Cプロテアーゼのようなこれら2つの特性を有して存在する(Nilsson et al., 1997)。切断後プロテアーゼを容易に捕捉する能力は、考えられる別の因子であり、GSTへ融合された商業的に入手可能な3Cプロテアーゼの選択へとつながった。該3Cプロテアーゼ切断部位EALFQG(配列番号6)(Miyashita et al., 1996; Wang et al., 1997)を、GST-SSAO融合構築物に導入した(図1)。

【0048】

GST-SSAOフラグメントを、GST-SSAO融合タンパク質の、培養培地への分泌を達成するためのシグナル配列とともにインフレームでクローニングした。マウス抗体の重鎖由来のシグナル配列を使用した(図1参照)。最終的な構築物(配列番号19および20)は、こうして、抗体シグナルペプチド、18アミノ酸スペーサー領域、突然変異性GSTタンパク質、3Cプロテアーゼのための基質配列およびヒト大動脈cDNAからクローニングされたヒトSSAOタンパク質の残基29-763を含む融合タンパク質をコードした(図1)。非修飾GST-SSAO融合タンパク質の計算された分子量は、112kDaである。

【0049】

実施例4: GST-SSAO発現ベクターでトランスフェクトされたHEK293細胞からの調質された培地上での当初の分析

GST-SSAO発現ベクターpMB887で安定的にトランスフェクトされたHEK293細胞の小規模の培養からの調質培地におけるベンジルアミンオキシダーゼ活性は、GST-SSAOが培養培地中に分泌されたことを示した。更なる分析は、グルタチオン-セファロースビーズを使用して、調質培地から直接的に少量のGST-SSAO融合タンパク質を精製し得ること(データ示さず)、そして精製された剤濾うはベンジルアミンオキシダーゼ活性を有することが、示された。興味深いことに、GST-SSAO融合タンパク質が、グルタチオン-セファロースビーズ上に固定化されたとき、活性であることが見出された。調質培地中のGST-SSAO融合タンパク質の量は、ビーズ上に捕捉されたタンパク質の量の評価によって、~1mg/Lであると計算された。

【0050】

実施例5: GST-SSAO融合タンパク質の分取精製および部位特異的切断

アフィニティ精製に基づく手法の概略は、図2に示す。精製の結果は、表1にまとめた。1つの選択されたクローンは拡張し、そしてCell Factriesで生長し、より多量の、精製のためのGST-SSAOを生成した。収集した調質された培地を濃縮およびろ過し、グルタチオン-セファロースカラム上に負荷するための時間を減少させた。次いで、グルタチオン-アフィニティクロマトグラフィーを、濃縮およびろ過した調質された培地からG

10

20

30

40

50

S T - S S A O 融合タンパク質を精製するため適用した。カラム上に捕捉されたタンパク質を、20 mM G S H で溶出させ、そして S D S - P A G E で還元条件で分析した。これは、G S T - S S A O 融合タンパク質が高純度を有すること、および単一の工程で培養培地中の多量の他のタンパク質から単離し得ることを示した。G S T - S S A O 融合タンパク質は、分子量マーカの 116 k D a タンパク質とのレベルで移動した。全 8.8 mg のタンパク質を、グルタチオン - セファロースカラムから回収した。G S T - S S A O 融合タンパク質の特異的活性は、 $343 \text{ nmol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ であると決定された。興味深いことに、特異的活性は、還元剤 G S H を除去するバッファー交換工程によって、ほとんど 2 倍であった ($634 \text{ nmol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

【 0 0 5 1 】

10

グルタチオニアフィニティ精製された G S T - S S A O を、G S T - 3 C プロテアーゼ融合タンパク質 (46 k D a) で切断し、S S A O から G S T 融合パートナーを除去した。分析的実験は、切断がゆっくりだが正確であり、観察可能な副産物がないことを示唆した。さらに、完全な切断が、~48 時間インキュベーション後に取得され得る。切断混合物をグルタチオンセファロースカラムに通過させ、除去された G S T 融合パートナーおよび G S T - 3 C プロテアーゼを捕捉した。フロースルーマー材料を収集し、そして還元条件下で S D S - P A G E によって分析し、これは ~97 k D a の分子量の予測された S S A O 産物のみを示した。捕捉された材料をまた分析し、これは G S T 融合パートナー (~28 k D a) および G S T - 3 C プロテアーゼのみを示した。これは、完全な切断が起こったこと、およびすべての G S T 含有タンパク質が、グルタチオン - セファロースカラム上に捕捉されたことを示した。またすべての S S A O タンパク質がカラムを経由して通過したことを見た。なぜなら、S S A O タンパク質が溶出された材料中に見出されなかつたからである。

20

【 0 0 5 2 】

20

精製 S S A O タンパク質の特異的活性は、 $522 \text{ nmol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ であると決定された。これは切断前に決定された特異的活性よりも小さかった。D T T を使用して、G S T - S S A O 融合タンパク質の切断中の 3 C プロテアーゼ活性を確保したから、我々は、切断バッファーが S S A O ホモダイマー中の可能なジスルフィド架橋に影響したかいなか見るため、S D S - P A G E 分析（非還元性）を作成した (Kurkijaervi et al., 1998; Smith et al., 1998; Salminen et al., 1998)。推定された S S A O モノマー (~97 k D a) のみが、みられ得る（データ示さず）。しかし、S S A O タンパク質は、5 での貯蔵中に、~170 k D a のサイズにトランスフォームし (S D S - P A G E によって分析した)、このことは、1 またはいくつかのジスルフィドが形成されたことを示した。切断バッファーを、透析ろ過 (diafiltration) によって除去し、そして S D S - P A G E 分析は、該 S S A O タンパク質がなお明らかにダイマー性であり、分子量が ~170 k D a であることを示した。全部で 3.6 mg の組換え S S A O を、809 nmol · 分⁻¹ · mg⁻¹ の特異的活性を有する 9,4 リットルの調質培地から取得した。プロセスの全体収率は、決定されたベンジルアミノキシダーゼ活性に基づいて 22 % であった。

30

【 0 0 5 3 】

40

興味深いことに、G S T 融合パートナーは、S S A O タンパク質のベンジルアミノキシダーゼ活性に顕著には影響がなかった。バッファー交換工程後の精製 G S T - S S A O 融合タンパク質の特異的活性は、 $634 \text{ nmol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ と決定された。G S T 融合パートナーの除去後、S S A O の特異的活性は、 $809 \text{ nmol} \cdot \text{分}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ と決定された。しかし、G S T 融合パートナーの分子質量は、G S T - S S A O 融合タンパク質の ~25 % であり、そして G S T の除去後の特異的活性の増加は、同じ範囲であった。これは、該融合タンパク質を酵素特性把握のために使用する可能性を開く。さらに、アフィニティ融合パートナー、例えば G S T を使用して、固体支持体上に有向の態様で組換えタンパク質を結合または固定化し、例えばタンパク質 - タンパク質相互作用および酵素特性把握を研究することができる (Nilsson et al., 1997)。G S T - S S A O 融合タン

50

パク質は、それをグルタチオン - セファロースビーズに結合させたとき、実際に活性であった。

【 0 0 5 4 】

実施例 6 ; 精製された S S A O タンパク質の当初の特性把握

ゲルろ過実験を実施し、非変性条件下での S S A O タンパク質のサイズを分析した。非還元条件下で SDS - PAGE によって調査したとき、ダイマー性タンパク質として移動した S S A O タンパク質材料からのサンプルを、キャリブレーションした分析的 Superdex 200カラム上に負荷した。S S A O タンパク質は、1 . 2 9 m l で溶出し、これはわずかにカタラーゼ (2 3 2 k D a) より早く、これは 1 . 3 5 m l で溶出した。

【 0 0 5 5 】

精製 S S A O タンパク質の N 末端アミノ酸配列決定は、G S T - 3 C プロテアーゼが、G S T - S S A O 融合タンパク質（図 1 ）中の 3 C プロテアーゼ基質配列 E A L F Q G （配列番号 6 ）を特異的に切断することを示した。2 9 アミノ酸を決定し、そして予測された S S A O アミノ酸配列（配列番号 2 ）中の残基数 2 9 - 5 8 に正確に対応した。N 末端配列決定をまた、G S T - S S A O 融合タンパク質について実施し、これは、シグナルペプチドが、予測されたとおり保有されたことを示した。

【 0 0 5 6 】

最後に、精製 S S A O タンパク質は、予測されたようにセミカルバジドによる阻害に感受性であることが見出された。0 . 1 mM のセミカルバジドの存在下、9 5 % より多いベンジルアミンオキシダーゼ活性が阻害された。

【 0 0 5 7 】

【 表 1 】

10

20

表1 組み換えヒトSSAOの精製

精製工程（サンプル）	総体積 (ml)	総タンパク質 (mg)	全SSAO活性 ^a (nmol分 ⁻¹)	特異的活性 (nmol分 ⁻¹ mg ⁻¹)	收率 (%)
調質培地	9400	9024	9243	1.0	—
濃縮培地	600	9060	13200	1.5	100
ろ液	850	9065	11900	1.3	90
GSH-アフィニティ工程-1（溶出液）	6.8	8.8	3029	343	23
バッファー交換	15	8.9	5624 ^b	634 ^b	43
GSH-アフィニティ工程-2（プロテアーゼ） ^c	36	5.5	2859	522	22
透析ろ液 ^d	4.2	3.6	2919	809	22

^a 活性は、基質として0.5 mMのベンジルアミンを使用して、分あたりの生産されたH₂O₂のnmol/L量として測定した。

SSAO活性を、阻害剤として0.1 mMのセミカルバジドで確認した。

5 mMのDTTおよびGST-3Cプロテアーゼの添加前に測定した。

この工程を、GST-SSAO融合タンパク質の部位特異的切断後に実施し、除去されたGST融合パートナーおよびGST-3Cプロテアーゼを捕捉した。

^b バッファー交換および限外ろ過によるサンブル濃縮。

引用文献

【表2】

- Blom, N., Hansen, J., Blaas, D. and Brunak, S. (1996) Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: Discovering cellular targets by neural networks. *Protein Science* 5, 2203-2216.
- Boomsma, F., van Veldhuisen, D. J., de Kam, P. J., Man in't Veld, A. J., Mosterd, A., Lie, K. I., and Schalekamp, M. A. (1997) Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc. Res.* 33(2), 387-391. 10
- Boomsma, F., van den Meiracker, A. H., Winkel, S., Aanstoot, H. J., Batstra, M. R., Man in 't Veld, A. J., and Bruining, G. J. (1999) Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in type I (insulin-dependent), in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis. *Diabetologia* 42(2), 233-237.
- Boor, P. J., and Hysmith, R. M. (1987) Allylamine cardiovascular toxicity. *Toxicology* 44(2), 129-145. 20
- Buffoni, F. (1993) Properties, distribution and physiological role of semicarbazide-sensitive amine oxidases. *Curr. Top. Pharmacol.* 2, 33-49.
- Callingham, B. A., Crosbie, A. E., and Rous, B. A. (1995) Some aspects of the pathophysiology of semicarbazide-sensitive amine oxidase enzymes. *Prog. Brain Res.* 106, 305-321. 30
- Carter, P. (1990) Site-specific proteolysis of fusion proteins. In *Protein purification: From molecular mechanism to large-scale processes* (Am. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 427) (Ladish, M. R., Willson, R. C., Painton, C. C., and Builder, S. E., eds), pp. 181-193, American Chemical Society Press.

【0 0 5 9】

【表3】

- Castillo, V., Lizcano, J. M., Visa J., and Unzeta, M. (1998) Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) from human and bovine cerebrovascular tissues: biochemical and immunohistological characterization. *Neurochem. Int.* 33(5), 415-423.
- Conklin, D. J., Langford, S. D., and Boor, P. J. (1998) Contribution of serum and cellular semicarbazide-sensitive amine oxidase to amine metabolism and cardiovascular toxicity. *Toxicol. Sci.* 46(2), 386-392.
- Dwyer, M. A., Huang, A. J., Pan, C. Q., and Lazarus, R. A. Expression and characterization of a DNase I-Fc fusion enzyme. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(14), 9738-9743. 10
- Ekblom, J. (1998) Potential therapeutic value of drugs inhibiting semicarbazide-sensitive amine oxidase: vascular cytoprotection in diabetes mellitus. *Pharmacol. Res.* 37(2), 87-92.
- Gräslund, T., Nilsson, J., Lindberg, A. M., Uhlén, M., and Nygren, P. Å. (1997) Production of a thermostable DNA polymerase by site-specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Expression Purif.* 9(1), 125-132. 20
- Hartmann, C., and McIntire, W. S. (1997) Amine-oxidizing quinoproteins. *Methods Enzymol.* 280, 98-150.
- Hollenbaugh, D., Chalupny, N. J., and Aruffo, A. (1992) Recombinant globulins: novel research tools and possible pharmaceuticals. *Curr. Opin. Immunol.* 4(2), 216-219.
- Holt, A., Sharman, D. F., Baker, G. B., and Palcic, M. M. (1997) A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 244(2), 384-392. 30
- Holt, A., Alton, G., Scaman, C. H., Loppnow, G. R., Szpacenko, A., Svendsen, I., and Palcic, M. M. (1998) Identification of the quinone cofactor in mammalian semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochemistry* 37(14), 4946-4957.

【 0 0 6 0 】

【 表 4 】

Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997) Membrane protein secretases. *Biochem J.* 321(Pt 2), 265-279.

Imamura, Y., Noda, S., Mashima, Y., Kudoh, J., Oguchi, Y., and Shimizu, N. (1998) Human retina-specific amine oxidase: genomic structure of the gene (AOC2), alternatively spliced variant, and mRNA expression in retina. *Genomics* 51(2), 293-298.

Jaakkola, K., Kaunismaki, K., Tohka, S., Yegutkin, G., Vanttila, E., Havila, T., Pelliniemi, L. J., Virolainen, M., Jalkanen, S., and Salmi, M. (1999) Human vascular adhesion protein-1 in smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* 155(6), 1953-1965. 10

Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service National Institutes of Health) NIH Publication No. 91-3242.

Kurkijärvi, R., Adams D. H., Leino R., Mottonen T., Jalkanen S., and Salmi, M. (1998) Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): Increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J. Immunol.* 161, 1549-1557. 20

Larsson, L. N., Johansson, C., Lindholm, L., and Holmgren, J. (1988) Mouse monoclonal antibodies for experimental immunotherapy promotes killing of tumor cells. *Int. J. Cancer* 42, 877-882.

Lewinsohn, R. (1984) Mammalian monoamine-oxidizing enzymes, with special reference to benzylamine oxidase in human tissues. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 17(3-4), 223-256. 30

Liang, J. F., Li, Y. T., and Yang, V. C. (2000) Biomedical application of immobilized enzymes. *J. Pharm. Sci.* 89(8), 979-990.

Linder, M., Nevanen, T., Söderholm, L., Bengs, O., and Teeri, T. T. (1998) Improved immobilization of fusion proteins via cellulose-binding domains. *Biotechnol. Bioeng.* 60(5), 642-647.

40

【 0 0 6 1 】

【 表 5 】

Lim, K., Ho, J. X., Keeling, K., Gilliland, G. L., Ji, X., Ruker, F., and Carter, D. C. (1994) Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathion S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci.* 3(12), 2233-2244.

Lo, K. M., Sudo, Y., Chen, J., Li, Y., Lan, Y., Kong, S. M., Chen, L., An, Q., and Gillies, S. D. (1998) High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng.* 11(6), 495-500.

Lyles, G. A. (1996) Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(3), 259-274.

Lyles, G. A., and Pino, R. (1998) Properties and functions of tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases in isolated cell preparations and cell cultures. *J. Neural. Transm. Suppl.* 52, 239-250.

Meszaros, Z., Karadi, I., Csanyi, A., Szombathy, T., Romics, L., and Magyar, K. (1999) Determination of human serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: a possible clinical marker of atherosclerosis. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 24(4), 299-302.

Miyashita, K., Okunishi, J., Utsumi, R., Komano, T., Tamura, T., and Satoh, N. (1996) Cleavage specificity of coxsackievirus 3C proteinase for peptide substrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(4), 705-707.

Morris, N. J., Ducret, A., Aebersold, R., Ross, S. A., Keller, S.R., and Lienhard, G. E. (1997) Membrane amine oxidase cloning and identification as a major protein in the adipocyte plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 9388-9392.

Müller, K. M., Arndt, K. M., and Alber, T. (2000) Protein fusions to coiled-coil domains. *Methods Enzymol.* 328, 261-282.

Nakos, G., and Gossrau, R. (1994) Light microscopic visualization of semicarbazide-sensitive amine oxidase (benzylamine oxidase) using a cerium method. *Folia Histochem. Cytobiol.* 32(1), 3-10.

Nilsson, J., Larsson, M., Ståhl, S., Nygren, P. Å., and Uhlén, M. (1996) Multiple affinity domains for the detection, purification and immobilization of recombinant proteins. *J. Mol. Recognit.* 9(5-6), 585-594.

Nilsson, J., Ståhl S., Lundeberg J., Uhlén M., and Nygren, P. Å. (1997) Affinity fusion strategies for detection, purification and immobilization of recombinant proteins.

Protein Expression Purif. 11, 1-16.

Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Ståhl, S., Uhlén, M., and Nygren, P. Å. (1997) Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat. Biotechnol.* 15(8), 772-777.

Nygren, P. Å., and Uhlén, M. (1997) Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7(4), 463-469.

Rieker, J. D., and Hu, J. C. (2000) Molecular applications of fusions to leucine zippers. *Methods Enzymol.* 328, 282-296.

Sakurai, T., Roonprapunt, C., and Grumet, M. (1998) Purification of Ig-fusion proteins from medium containing Ig. *Biotechniques* 25(3), 382-385.

Saleemuddin M (1999) Bioaffinity based immobilization of enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 64, 203-226.

Salminen, T. A., Smith, D. J., Jalkanen, S., and Johnson, M. S. (1998) Structural model of the catalytic domain of an enzyme with cell adhesion activity: human vascular adhesion protein-1 (HVAP-1) D4 domain is an amine oxidase. *Protein Eng.* 11(12), 1195-204.

10

20

30

【 0 0 6 3 】

【 表 7 】

Sheibani, N. (1999) Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins. *Prep. Biochem. & Biotechnol.* 29, 77-90.

Shpigel, E., Goldlust, A., Efroni, G., Avraham, A., Eshel, A., Dekel, M., and Shoseyov, O. (1999) Immobilization of recombinant heparinase I fused to cellulose-binding domain. *Biotechnol. Bioeng.* 65(1), 17-23.

Skerra, A. (2000) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 13(4), 167-187.

10

Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.

Smith, D. J., Salmi, M., Bono, P., Hellman, J., Leu, T., and Jalkanen, S. (1998) Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 188, 17-27.

Tischer, W., and Kasche, V. (1999) Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17(8), 326-335.

20

Tomme, P., Boraston, A., McLean, B., Kormos, J., Creagh, A. L., Sturch, K., Gilkes, N. R., Haynes, C. A., Warren, R. A., and Kilburn, D. G. (1998) Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 715(1), 283-296.

Tudyka, T., and Skerra, A. (1997) Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 6, 2180-2187.

30

Turkova, J. (1999) Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 722(1-2), 11-31.

【 0 0 6 4 】

【 表 8 】

Uhlén, M., Forsberg, G., Moks T., Hartmanis, M., and Nilsson, B. (1992) Fusion proteins in Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 363-369.

Wang, Q. M., Johnson, R. B., Cox, G. A., Villarreal, E. C., and Loncharich, R. J. (1997) A continuous colorimetric assay for rhinovirus-14 3C protease using peptide p-nitroanilides as substrates. *Anal. Biochem.* 252(2), 238-245.

Walker, P.A., Leong, L. E., Ng, P. W., Tan, S. H., Waller, S., Murphy, D., and Porter, A. G. (1994) Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant fusion proteases. *Bio/Technology* 12, 601-605.

10

Wimmerova, M., and Macholan, L. (1999) Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation. *Biosens. Bioelectron.* 14(8-9), 695-702.

Yu, P. H. and Zuo, D. M. (1993) Oxidative deamination of methylamine by semicarbazide-sensitive amine oxidase leads to cytotoxic damage in endothelial cells. Possible consequences for diabetes. *Diabetes* 42(4), 594-603.

20

Yu, P. H., Zuo, D. M., and Davis, B. A. (1994) Characterization of human serum and umbilical artery semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO). Species heterogeneity and stereoisomeric specificity. *Biochem. Pharmacol.* 47(6), 1055-1059.

Zhang, X., Kim, J., and McIntire, W. S. (1995) cDNA sequences of variant forms of human placenta diamine oxidase. *Biochem. Genet.* 33(7-8), 261-268.

Zhang, X. and McIntire, W. S. (1996) Cloning and sequencing of a copper-containing topa quinone-containing monoamine oxidase from human placenta. *Gene* 179, 279-286.

30

【図面の簡単な説明】

【0 0 6 5】

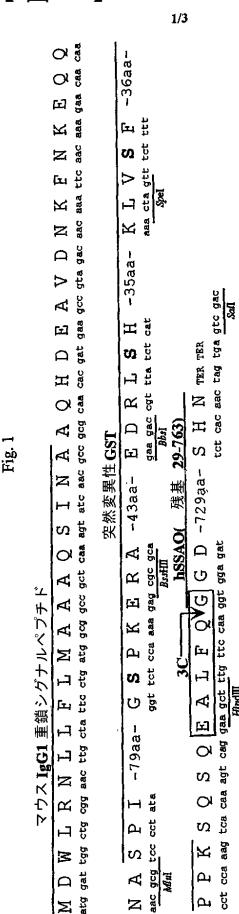
【図1】図1は、GST - SSAO DNA構築物の概略図である。GST融合パートナーにおける3つのシステインからセリンへの突然変異（GenBank受託番号M14654を有する配列による残基85、138および178）は、太字で示される。ボックスを付した配列は、3Cプロテアーゼの認識配列を示す。

【図2】図2は、SSAO精製プロセスの概観である。それぞれの精製工程について決定された特異的活性を示す。

【図3】図3は、pMB887と命名されたGST - SSAO発現ベクターの概略図である。

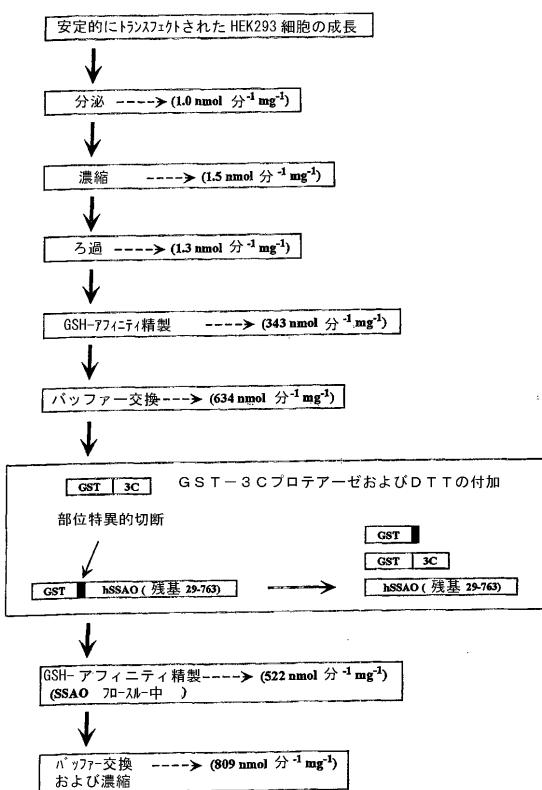
40

【図1】

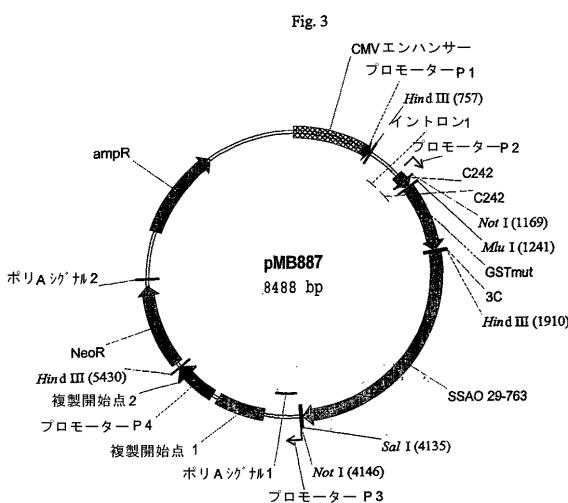


【図2】

Fig. 2



【図3】



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/06669 A1(51) International Patent Classification: C12P 21/02, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
C12N 15/12 // 15/62

(21) International Application Number: PCT/SI02/00277

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

(22) International Filing Date: 18 February 2002 (18.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01/0625-3 23 February 2001 (23.02.2001) SE
60/272,247 28 February 2001 (28.02.2001) US

Declaration under Rule 4.17:

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

(71) Applicant (for all designated States except US): BIOVITRUM AB [SE/SI]; S-112 76 Stockholm (SI).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ABRAHMSÉN, Lars [SE/SI]; Liljängsgatan 28, S-168 88 Bromma (SI). NILSSON, Joakim [SE/SI]; Mörbyvägen 5, S-182 52 Danderyd (SE).

(74) Agent: HÖGLUND, Lars; Biovitrum AB, S-112 76 Stockholm (SE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SJ, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BH, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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

A1

WO 02/06669

(54) Title: METHOD FOR PURIFICATION OF SOLUBLE SSAO

(57) Abstract: The present invention relates to a recombinant construct comprising a nucleotide sequence encoding a fusion protein comprising a soluble form a human SSAO (Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase), a scorable fusion partner, a signal peptide, and a protease cleavage site. The said construct is useful in methods for purification of a soluble form of human SSAO.

Method for purification of soluble SSAO

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a recombinant construct comprising a nucleotide sequence encoding a fusion protein comprising a soluble form of human semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO), a secretable fusion partner, a signal peptide, and a protease cleavage site. The invention also relates to methods for purification of a soluble form of human SSAO, said methods utilizing the recombinant construct.

10 BACKGROUND ART

Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAOs) belong to the copper-containing amine oxidase family of enzymes (CuAO; EC.1.4.3.6) and are widely distributed among both eukaryotic and prokaryotic organisms (Buffoni, 1993). The physiological role of this abundant enzyme is essentially unknown and endogenous substrates with high affinity have so far not been identified, although benzylamine is an artificial high-affinity substrate (Buffoni, 1993; Callingham et al., 1995; Lyles, 1996, Hartmann and McIntire, 1997; Holt et al., 1998). In humans high SSAO activity is found in vascular smooth muscle cells (Lewinsohn 1984; Nakos and Gossrau, 1994; Yu et al., 1994; Lyles and Pino, 1998; Jaakkola et al., 1999). SSAO activity has also been detected in smooth muscle cells of non-vascular type and in endothelial cells (Lewinsohn, 1984; Castillo et al., 1998; Jaakkola et al., 1999). Small amounts of SSAO protein is also found in blood showing similar properties compared to the tissue-bound form (Yu and Zuo, 1993; Yu et al., 1994; Kurkijarvi et al., 1998).

Many studies have demonstrated that SSAO activity in blood plasma is elevated in several human conditions such as heart failure, atherosclerosis and diabetes (Lewinsohn, 1984; Boomsma et al., 1997; Ekblom, 1998; Boomsma et al., 1999; Meszaros et al., 1999). The mechanism(s) underlying these alterations of enzyme activity are currently uncharacterized. It has been suggested that reactive aldehydes and hydrogen peroxide produced by endogenous amine oxidases could be causative or contribute to the progression of cardiovascular diseases, and that inhibition of SSAO activity in diabetics might decrease vascular complications (Ekblom, 1998).

Recently it was found that the cDNA sequence of human SSAO (Zhang and McIntire, 1996) is identical to the vascular adhesion protein 1 (VAP-1), which participates in lymphocyte recirculation by mediating the binding of lymphocytes to

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

2

peripheral lymph node vascular endothelial cells (Smith et al., 1998; see also WO 98/53049). The cDNA sequence of SSAO / VAP-1 is deposited under GenBank Accession Nos. U39447 and NM_003734 (SEQ ID NO:1). VAP-1 has also been found to be up-regulated on the endothelial cell surface under inflammatory conditions (Smith et al., 1998). However, the adhesive properties of SSAO have only been found in endothelial cells. In smooth muscle cells, SSAO does not support binding of lymphocytes (Jaakola et al., 1999). DNA-sequence analysis, structural modeling and experimental data suggest that human SSAO is a homodimeric glycoprotein consisting of two 90-100 kDa subunits anchored to the plasma membrane by a single N-terminal membrane spanning domain (Morris et al., 1997; Smith et al., 1998; Salminen et al., 1998).

No reports have so far been published regarding the purification of a recombinant mammalian SSAO or purification to near homogeneity of larger amounts of a human SSAO from a natural source. One report has described the use of a FLAG peptide fused to the N-terminal end of full-length human SSAO for detection purposes, but no results were presented regarding its use for purification of the human SSAO protein (Smith et al., 1998). Monoclonal antibodies have been used to immunoaffinity purify small amounts of human SSAO from serum and tissue homogenates for immunoblotting (Smith et al., 1998; Kurkijärvi et al., 1998). Consequently, there is a need for alternative methods for the purification of human SSAO in significant amounts.

Glutathione S-transferase (GST) from *Schistosoma japonicum* is a homodimeric cytoplasmic enzyme that can be purified by affinity chromatography using immobilized cofactor glutathione, followed by competitive elution using reduced glutathione (GSH). Taking advantage of this specific interaction, a gene fusion system for *E. coli* intracellular expression was developed by Smith and co-workers (Smith & Johnson, 1988; see also WO 88/09372) to facilitate detection and purification of recombinant proteins fused to GST. A potential drawback with using GST as fusion partner is the possibility that the free cysteines on its surface can crosslink with free cysteines on e.g. the fused target protein when exposed to an oxidizing environment. To minimize this risk and to allow for secretion of GST-fusion proteins a mutant form of GST was recently developed, which retain both its ability to form homo-dimers and its enzyme activity (Tudyka and Skerra, 1997). The homo-dimerization propensity of GST can be

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

3

used to provoke dimerization of the fused target protein e.g. for the purpose of increased avidity effects (Tudyka and Skerra, 1997).

Alternative homodimeric fusion partners described in the literature are e.g. the Fc region of immunoglobulins (Hollenbaugh et al., 1992; Sakurai et al., 1998; Lo et al., 1998; Dwyer et al., 1999) and leucine zippers such as GCN4 (Rieker and Hu, 2000; Müller et al., 2000). Several different proteins have been fused to these homodimeric protein domains for different purposes e.g. to increase avidity (Dwyer et al., 1999; Müller et al., 2000) and to restore high-affinity DNA binding of truncated DNA-binding proteins (Rieker and Hu, 2000). Fc-fusion protein can be purified by protein A-affinity chromatography involving elution with low pH buffers (Sakurai et al., 1998; Lo et al., 1998), which may decrease activity of the fused target protein (Gräslund et al., 1997). Another problem associated with using Fc as fusion partner is the use of serum for cell growth, which complicate detection and purification of secreted Fc-fusions since serum contains large amounts of immunoglobulins (Sakurai et al., 1998). The leucine zipper GCN4 has mostly been used as fusion partner for proteins expressed in *E. coli* (Müller et al., 2000) and an affinity-tag might has to be fused to facilitate purification.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a schematic illustration of a GST-SSAO DNA construct. The three cysteine to serine mutations (residues 85, 138, and 178 according to the sequence having GenBank Accession No. M14654) in the GST fusion partner are shown with boldface letters. Boxed sequence represents the recognition sequence for the 3C-protease.

Fig. 2 is an overview of an SSAO purification process. The determined specific activities for each purification step are indicated.

Fig. 3 is a schematic illustration of the GST-SSAO expression vector designated pMB887.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

According to the present invention, it has unexpectedly been found that soluble human SSAO can be produced in milligram quantities in a purification system utilizing a fusion partner capable of enabling dimerization of soluble SSAO. Consequently, in a first aspect this invention provides a recombinant construct comprising a nucleotide sequence encoding a fusion protein comprising:

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

4

- (i) a soluble form of human SSAO;
- (ii) a secretable fusion partner enabling dimerization of SSAO;
- (iii) a signal peptide allowing for secretion of a polypeptide from a host cell into the culture medium; and
- 5 (iv) a protease cleavage site located between the human SSAO variant and the fusion partner.

As will be understood by the skilled person, the recombinant construct can optionally comprise one or more nucleotide sequences coding for spacer amino acid sequences of various lengths. Such spacer sequences could be used in order to increase 10 the flexibility within the fusion protein, or to increase the space between protein domains so that folding can take place independently of adjacent domains. Further, spacers could be useful for increasing the accessibility for a protease to cleave at an introduced cleavage recognition sequence.

The soluble form of human SSAO is preferably lacking the membrane spanning 15 portion of wild-type human SSAO. The membrane spanning portion of the SSAO polypeptide is known in the art (Morris et al., 1997; Holt et al., 1998; Smith et al., 1998) and is essentially set forth as amino acids 5 to 27, in particular amino acids 6 to 26, of SEQ ID NO:2.

The amino acid sequence for human SSAO, excluding the membrane spanning 20 portion, preferably comprises, or essentially consists of, positions 29 to 763 in SEQ ID NO:2. However, the skilled person will understand that a part of the membrane-spanning portion could be included in the SSAO polypeptide while the polypeptide would still retain its essentially soluble properties. Consequently, the amino acid sequence for human SSAO could comprise e.g. positions 27 to 763, or 28 to 763, of 25 SEQ ID NO:2, including fragments thereof having substantially the biological activities of human SSAO. Further, the term "human SSAO polypeptide" is intended to encompass mutants and naturally occurring variants of human SSAO, either having retained enzymatic activity or protein interaction (e.g. adhesion function), or designed to facilitate structural studies (e.g. improved properties for crystallization), or mutated 30 to facilitate studies of structure/function relationships (which also includes inactive mutants).

The fusion partner can be fused to the C-terminal or N-terminal portion of the human SSAO polypeptide. It is envisaged that the fusion protein could comprise more than one fusion partner, for instance one fused to the N-terminal and one fused to the C-

terminal part of SSAO. An additional fusion partner could be an additional affinity tag, or a reporter protein such as Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).

A large number of different gene fusion systems and fusion partners have been described. In such systems, different types of interactions, such as enzyme–substrate, bacterial receptor–serum protein, polyhistidines–metal ion, and antibody–antigen, have been utilized (Uhlén et al., 1992). Various gene fusion systems for affinity purification are also known in the art. Examples of fusion partners used in such systems (for reviews, see e.g. Nilsson et al., 1997; or Sheibani, 1999) comprise staphylococcal Protein A and its derivative Z; the albumin-binding protein from streptococcal Protein G; glutathione S-transferase (GST); polyhistidine tags; biotinylated affinity tags (e.g Biotin AviTag); *E. coli* maltose-binding protein; cellulose binding domains; the FLAG peptide; and *Stag*. Alternative systems may be engineered using protein scaffolds for generation of novel ligand receptors (see Skerra, 2000, and references therein). These novel binding proteins, e.g. affibodies, may then be useful as fusion partners for different applications (Nygren and Uhlén, 1997; Nord et al., 1997).

According to this invention, the said fusion partner should enable dimerization of SSAO. A suitable fusion partner is glutathione S-transferase (GST), because of its propensity to dimerize and because the purification procedure has the potential to be performed under mild conditions using chromatography media with immobilized glutathione (e.g. from Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). In addition, GST can conveniently be detected either by its enzymatic activity or by the use of GST specific antibodies or glutathione, using commercially available GST detection systems (e.g. from Amersham Pharmacia Biotech). The fusion partner could also be a functionally equivalent variant of GST, having retained propensity for dimerization and having binding properties allowing affinity purification. The said fusion partner is more preferably a variant of *S. japonicum* GST (GenBank Accession No. M14654; SEQ ID NOS:3 and 4), designed for secretion out of the host cell, having one or more of the cysteine residues in positions 85, 138, and 178 replaced with other amino acid residue(s). Most preferably, the said variant has all the cysteine residues in positions 85, 138, and 178 replaced with serine residues (see Tudyka & Skerra, 1997 and SEQ ID NO:5).

In addition, the said recombinant construct should comprise a nucleotide sequence encoding an N-terminal signal peptide, which allows for secretion of the said fusion protein from a host cell into the culture medium. For production of a human

protein such as SSAO in a eukaryotic cell a homologous signal peptide is preferred. For production of SSAO in HEK293 cells e.g. a mouse IgG1 heavy chain signal peptide (Kabat et al., 1991) may be used. Other suitable signal peptides are known in the art and are described in e.g. Kabat et al., *supra*.

5 Several methods have been described for site-specific cleavage of fusion proteins based on treatment with chemical agents such as CNBr or hydroxylamine, or enzymes such as enterokinases, Factor Xa, thrombin, subtilisin or other proteases (see e.g. Nilsson et al. (1997) and references therein). According to this invention, the said fusion partner can conveniently be removed from human SSAO by protease cleavage.

10 The protease to be used for cleavage can e.g. be a 3C protease from the picornavirus family, e.g. a rhinovirus or enterovirus 3C protease (Walker et al., 1994). Consequently, the protease cleavage site can preferably be a cleavage site for a 3C-protease from the picornavirus family, e.g. a rhinovirus or enterovirus 3C protease. In one exemplified form of the invention, the said 3C-protease cleavage site comprises the amino acid sequence EALFQG (SEQ ID NO:6). However, the skilled person will be able to identify other suitable cleavage sites, see e.g. Blom et al. (1996) and references therein.

15 The recombinant construct according to the invention could e.g. comprise a nucleotide sequence encoding essentially the amino acid sequence shown in Figure 1.

20 The invention also provides an expression vector, prepared according to standard methods, comprising the recombinant construct according to the invention. Such an expression vector is exemplified by the expression vector termed pMB887, shown in Figure 3.

In another aspect, the invention provides a method for the purification of a recombinant human SSAO polypeptide comprising the steps of:

- 25 (i) transfecting cells with an expression vector according to the invention, as defined above;
- (ii) culturing the said cells under conditions allowing for the fusion protein expressed by the vector to be secreted into the cell medium;
- (iii) binding the obtained fusion protein to a medium comprising a ligand having affinity for the fusion partner;
- (iv) separating the said fusion partner and the SSAO polypeptide; and
- (v) recovering the purified human SSAO polypeptide.

The fusion partner can be separated from the human SSAO variant either when the fusion protein is still attached to the affinity ligand, or when the fusion protein has

been released from the affinity ligand. When the said fusion partner is GST, the said ligand having affinity for the fusion partner is preferably glutathione, or a derivative thereof. Alternatively, antibodies directed to GST could be used as affinity ligands.

As mentioned above, the fusion partner can be separated from human SSAO by protease cleavage with e.g. a picornavirus, such as rhinovirus, 3C-protease. The said protease can be fused to a fusion partner, thereby obtaining a "fusion protease" (see Walker et al., 1994; Gräslund et al., 1997). Such a fusion partner can conveniently be the same fusion partner as used for the SSAO polypeptide, e.g. glutathione S-transferase. However, other suitable fusion partners for proteases, such as albumin-binding protein from streptococcal Protein G, are known in the art, see e.g. Gräslund et al., 1997. The said fusion protease can be separated from the SSAO polypeptide by a process comprising binding the fusion protease to a medium comprising a ligand having affinity for the said fusion partner. Consequently, when the fusion partner is GST, the said ligand is preferably glutathione, or a derivative thereof. As mentioned above, antibodies directed to the fusion partner could also be used as affinity ligands. A commercially available system is the PreScission Protease (Amersham Pharmacia Biotech,) which is a genetically engineered fusion protein consisting of *S. japonicum* GST and human rhinovirus 3C protease.

For certain application, it might be advantageous to have SSAO immobilized. This may be achieved e.g. by an affinity-tag such as GST as described above. Examples of applications where a fusion protein is immobilized via an affinity-tag include: capture of protein ligands, analysis of protein-protein interactions, and use in bioreactors (Nilsson et al., 1996; Nord et al., 1997; Shpigel et al., 1999). However, many alternative methods for protein immobilization are described (see e.g. Tischer and Kasche, 1999, and references therein), that also may be applicable for immobilization of GST-SSAO or SSAO after removal of the fusion partner, such as covalent binding and non-covalent adsorption. In addition, the SSAO protein might also be encapsulated in e.g. sol-gel or an artificial cell e.g. a liposome (see e.g. Liang et al., 2000, and references therein).

One advantage with an affinity-tag such as GST is that an oriented immobilization can be achieved, often in a one-step procedure directly from e.g. a cell lysate (Nilsson et al., 1997; Saleemuddin, 1999). This may result in good steric accessibility of active binding sites and increased stability (Saleemuddin, 1999; Turkova, 1999). Examples of alternative affinity-tag approaches that has been used for

immobilization of proteins are e.g. peptides and proteins that can be specifically biotinylated by biotin ligase and used as fusion partners to take advantage of the very strong interaction ($K_d \sim 10^{-15}$) between biotin and streptavidin or avidin (Nilsson et al., 1997), and CBDs which binds specifically to cellulose (Linder et al., 1998; Tomme et al., 1998). Oriented immobilization of a protein may also be achieved by using immobilized antibodies that binds the protein or through carbohydrate moieties that may be present on the protein surface (Turkova, 1999).

Recently, amine oxidase from pea seedlings was immobilized using a modified carbon paste to a biosensor for determination of biogenic and synthetic amines 10 (Wimmerova and Macholan, 1999). Similarly, recombinant human SSAO might be immobilized for construction of biosensors to detect e.g. the cardiovascular toxin allylamine which is used in industrial organic processes and is a substrate for SSAO (Boor and Hysmith, 1987; Conklin et al., 1998). When immobilized, recombinant SSAO may be envisioned to mimic a membrane-anchored SSAO and its characteristics, 15 which might differ from the soluble state.

Consequently, as shown in the following examples, the invention provides a procedure for the production of a highly purified soluble recombinant human SSAO with enzymatic activity. The exemplified procedure involves the use of a mutant form 20 of *S. japonicum* glutathione S-transferase (GST), designed for transport out of the host cells (Tudyka and Skerra, 1997), as an affinity fusion partner. The fusion protein was secreted from mammalian cells and could be purified directly from the culture medium by glutathione-affinity chromatography. By specific proteolysis and an additional glutathione-affinity chromatography step, the fusion partner and the protease were removed, whereby pure, soluble and highly active recombinant human SSAO protein 25 was obtained in milligram quantities. To the inventors' knowledge, this is the first time an active recombinant soluble form of the human SSAO protein has been produced and purified to near homogeneity.

It is believed that the disclosed process for production of recombinant human SSAO will be applicable also to other mammalian amine oxidases, such as the human 30 placenta diamine oxidase (Zhang et al., 1995) and the human retina-specific amine oxidase (Imamura et al., 1998), as well as for other secretable proteins. The disclosed process may also facilitate the discovery and identification of modifications e.g. the identification of the active site cofactor, e.g. by isolation of cofactor-containing peptides or by crystal structure determination.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

9

In the following examples, it is shown that SSAO is active and soluble without its transmembrane region, and that GST can be proteolytically removed. These findings support the hypothesis that SSAO is released into circulation by proteolytic cleavage near the transmembrane region (shedding), a process which is common for Type I and 5 Type II membrane proteins (Hooper et al., 1997). The elevated SSAO activity in plasma in e.g. diabetes (Boomsma et al., 1999) may thus be the consequence of increased proteolytic activity of a protease that cleave the membrane-anchored SSAO, or of increased surface localization increasing the substrate availability for an existing protease.

10 Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Suitable methods and materials are described below, although methods and materials similar or equivalent to those described herein can also be used in the practice or testing of the present invention. All publications, patent applications, 15 patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the 20 following detailed description, and from the claims.

EXPERIMENTAL METHODS

PCR-amplification and cloning of the human SSAO gene from aorta cDNA

25 Two PCR-primers were designed with the help of the published cDNA sequence of human placenta amine oxidase (GenBank Accession No. U39447; Zhang and McIntire, 1996). The 5'-primer XNQZ-15 (5'-CCG GAA TTC CAA CGC GTC CAT GAA CCA GAA GAC AAT CCT CGT G-3'; SEQ ID NO:7) was designed to hybridize to the 5'- end of the SSAO coding sequence including the ATG start codon and to 30 contain the restriction enzyme cleavage sites *Eco*RI and *Mlu*I for cloning. The 3'-primer XNQZ-17 (5'-CCC CCA AGC TTG TCG ACT CAC TAG TTG TGA GAG AGA AGC CCC CCC-3'; SEQ ID NO:8) was designed to hybridize to the 3'-end including the native stop codon TAG followed by an additional stop codon TGA and two restriction enzyme cleavage sites for cloning, *Sal*I and *Hind*III. As template for the PCR

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

10

0.5 µl human aorta or human smooth muscle cell QUICK-Clone cDNAs (1ng/µl, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) were tested. The following conditions was used for the PCR-reaction, 20 pmol of each primer XNQX-15 and XNQZ-17, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech), 5 µl 10x cDNA PCR reaction buffer (Clontech) in a total volume of 50 µl. Amplification was performed with a Perkin-Elmer 2400 thermocycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The PCR-program consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 3 min followed by a final extension at 72°C for 3 min. TA-cloning was then used to insert the PCR-product into the vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cloned PCR-fragment was sequenced in both directions according to a standard protocol for dye terminator cycle sequencing and analyzed on a DNA sequencer ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Construction of vectors for expression of SSAO in mammalian cells

15 A vector for expression of the complete SSAO protein in mammalian cells was prepared by insertion of the *Eco*RI and *Sall* fragment from the pCR2.1TOPO-SSAO vector into the same sites of the vector pCI-neo (Promega, Madison, WI), resulting in the vector pMB843. This vector was used as template for PCR-amplification of the region corresponding to residues 29-763 of the human SSAO (Zhang and McIntire, 1996). A 5'-primer 5'-GAG GAA GCT TTG TTC CAA GGT GGA GAT GGG GGT GAA-3' (SEQ ID NO:9) was synthesized containing codons for a partial 3C protease cleavage site (see below) and a *Hind*III restriction enzyme cleavage site upstream of the codon for residue 29. The 3'-primer 5'-GCA TTC TAG TTG TGG TTT GTC-3' (SEQ ID NO:10) is a pCI-neo vector specific primer annealing downstream of the cloned SSAO fragment. The resulting PCR-product was digested with *Hind*III and *Nor*I and cloned into the plasmid pET38b(+) (Novagen, Inc., Madison, WI) cut with same enzymes, resulting in pET38-SSAO. DNA sequencing was performed as described above to verify expected sequence of the cloned SSAO fragment.

20 A mutated form (SEQ ID NO:5) of the glutathione S-transferase (GST) from *S. japonicum* previously used as a secretable enzymatically active dimerization module for a recombinant protein (Tudyka and Skerra, 1997) was prepared by PCR-mediated mutagenesis and assembly of fragments as described below. The mutations was performed to replace three cysteine residues 85, 138, and 178 located close to the GST

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

11

protein surface as revealed in the crystal structure of the *S. japonicum* GST (Lim et al., 1994; Tudyka and Skerra, 1997) with serine residues in order to avoid unwanted disulphide formation after export of the GST fusion protein to an oxidizing environment (Tudyka and Skerra, 1997). The following PCR-primers were used to construct the 5 mutated GST and to introduce the first part of a 3C protease cleavage site (see below) as well as suitable restriction enzyme cleavage sites for cloning. In addition, the primers introduce internal restriction sites for control cleavage and for possibility to assemble PCR-fragments by ligation: ROEL-1 (5'-GCC GGA ATT CGA CGC GTC CCC TAT ACT AGG TTA TTG G-3'; SEQ ID NO:11) contains *Eco*RI and *Mlu*I for cloning and 10 anneals to codons 2-8 of GST (M14654); ROEL-2 (5'-CTC TGC GCG CTC TTT TGG AGA ACC CAA CAT GTT GTG C-3'; SEQ ID NO:12) contains a *Bss*HII site; ROEL-3 (5'-GGT TCT CCA AAA GAG CGC GCA GAG ATT TCA ATG CTT GAA G-3'; SEQ ID NO:13) contains a *Bss*HII site; ROEL-4 (5'-ATG AGA TAA ACG GTC TTC GAA CAT TTT CAG CAT TTC-3'; SEQ ID NO:14) contains a *Bbs*I site; ROEL-5 (5'-GTT CGA AGA CCG TTT ATC TCA TAA AAC ATA TTT AAA TGG TGA TC-3'; SEQ ID NO:15) contains a *Bbs*I site; ROEL-6 (5'-AAA AGA AAC TAG TTT TGG GAA CGC ATC CAG GCA-3'; SEQ ID NO:16) contains a *Spe*I site; ROEL-7 (5'-CCC AAA ACT AGT TTC TTT TAA AAA ACG TAT TGA AGC TAT C-3'; SEQ ID NO:17) contains a *Spe*I site; ROEL-8 (5'-ACC CAA GCT TCC TGA CTT TGT GAC TTT GGA GGA TGG TCG CCA CC-3'; SEQ ID NO:18) contains *Hind*III for cloning and anneals to codons 212-218 of GST (M14654). ROEL-8 will also introduce codons for a spacer-sequence SQSQ before a partial 3C protease cleavage site. Overlapping parts of the GST gene were amplified in separate PCR-reactions with primer pairs ROEL-1/2, ROEL-3/4, ROEL-4/5 and ROEL-7/8, using plasmid pGEX-6P-2 25 (Amersham Pharmacia Biotech) as template. This allowed the complete mutated GST gene to be assembled by mixing the four PCR-fragments and using them as templates in a PCR reaction with primers ROEL-1 and ROEL-8. The PCR-reactions was performed using the Advantage cDNA PCR Kit (Clontech). In the next step the GST fragment was digested with *Eco*RI and *Hind*III and cloned into the same sites of pUC18 (Amersham 30 Pharmacia Biotech), yielding pMB809. DNA sequencing was performed as described above to confirm the expected sequence of the mutated GST fragment. The pMB809 vector was cleaved with *Eco*RI and *Hind*III and the GST fragment was isolated and cloned upstream of the SSAO fragment in the pET38-SSAO vector cut with the same enzymes. This step resulted in the creation of a complete 3C protease cleavage site

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

12

EALFQG (SEQ ID NO:6) of human rhinovirus-14 and coxsackievirus (Miyashita et al., 1996; Wang et al., 1997) between GST and SSAO (residues 29-763) (see Fig. 1).

The GST-SSAO fragment was cloned in the *Mlu*I and *Sal*I site of the vector pMB565, in which a mutated signal sequence of a murine IgG1 heavy chain (Fig. 1) is 5 cloned in the multilinker of the mammalian expression vector pCI-neo (Promega). The resulting GST-SSAO expression vector was named pMB887 (Fig. 3).

Transfection and selection of stable clones

Three 25 cm² T-flasks were seeded with approximately 4x10⁵ human embryo 10 kidney 293 cells (HEK293 cells, ATCC CRL-1573, Rockville, MD). Cells were grown to ~50% confluence in growth medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM L-Glutamine. The FBS was heat-inactivated at 56°C for 30 min before mixed with the growth 15 medium components. The expression vector pMB887 was then introduced into the cells by liposome-mediated transfection using LipofectAMINE according to the manufacturer's recommendations (Life Technologies, Frederick, MD). After 48 hours of growth the medium was changed in all flasks to growth medium supplemented with 1 mg/ml geneticin (G418) for selection of stably transfected cells. Approximately two weeks later, resistant cells emerged and were grown to confluence. Cells from the three 20 T-flasks were pooled (clone-mixture) and diluted in growth medium supplemented with 1.2 mg/ml G418 and seeded in a 15-cm Petri dish. Individual colonies emerged after two weeks and were picked to be expanded individually for subsequent analysis of GST-SSAO production. Detection of GST proteins in collected medium from expanded clones was performed using the GST 96-Well Detection Module (Amersham Pharmacia 25 Biotech). Seven positive clones were selected and frozen.

Production of GST-SSAO in Cell Factories

Clone number 10 was expanded and cultured in growth medium containing 30 DMEM supplemented with 5 % FBS (heat-inactivated), 2 mM L-Glutamine and 1.2 mg/ml G418 and used to seed a 6320 cm² Nunc Cell Factory (Nalge Nunc Int., Naperville, IL) containing 1500 ml of growth medium and grown at 37°C. After four days of growth, cells were confluent and medium was collected. New growth medium (1500 ml) with reduced amount of FBS (2%) was then added to the cells in the same Cell Factory followed by harvest of conditioned medium after three days. This

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

13

procedure was repeated once resulting in a total of ~4.5 liters of harvested medium from one Cell Factory. Collected medium was centrifuged and stored at -70°C.

Concentration of conditioned cell medium

5 Frozen conditioned medium from two Cell Factories (9.4 liters) was thawed in a water-bath at 30°C. The material was pumped through an Omega membrane (MWCO (Molecular-Weight Cut-Off) 10000) using a Centramate ultra-filtration equipment (Pall Filtron, Northborough, MA), until a volume of 600 ml was achieved. The retentate was filtered through a 0.45 µm filter, Sartobran P, equipped with a 0.65 µm prefilter
10 (Sartorius, Göttingen, Germany). Remaining filtrate in tubings was displaced by 250 ml of phosphate-buffered saline (PBS) yielding 850 ml of filtered sample.

Purification and cleavage of GST-SSAO

The GST-SSAO fusion protein was purified by glutathione-affinity chromatography on a HR 10/10 column (Amersham Pharmacia Biotech) packed with 8 ml glutathione-Sepharose 4 Fast Flow (Binds ~10 mg GST/ml gel, Amersham Pharmacia Biotech), equilibrated with 10 column volumes of PBS. The filtered material (850 ml), was loaded at 0.9 ml/min over night at room temperature. Flow-through material was collected for analysis and stored at -20°C. After washing the column with 20 PBS, bound proteins were eluted with elution buffer (20 mM GSH, 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2).

The eluate was loaded on a HiPrep Desalt 26/10 column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with helium-sparged cleavage-buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 at 25°C) and the protein peak was collected. Cleavage 25 was started by adding DTT (dithiothreitol) to 5 mM and 380 units of PreScission protease (Amersham Pharmacia Biotech). The PreScission Protease is a genetically engineered fusion protein consisting of GST and human rhinovirus 3C protease and cleaves specifically between the Gln (Q) and Gly (G) residues of its recognition sequence.

30 The cleavage mixture was incubated at 5°C. After 63 hours of incubation the material was loaded on a glutathione-Sepharose column as described above, equilibrated with cleavage buffer. The flow-through (36 ml) was collected and stored at 5°C for approximately one week in an open tube. Samples were withdrawn and analyzed by SDS-PAGE (non-reducing). Proteins captured on the column were eluted

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

14

with elution buffer for analysis. The collected protein sample was applied on a JumboSep device (MWCO 30000, Pall Filtron) for buffer exchange and concentration. Five cycles of centrifugation and dilution with a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl were performed. A sample was taken for different analyses. The 5 buffer exchanged and concentrated material (4.2 ml) was then stored at -70°C.

Protein analyses

The purification and size of SSAO were analyzed by SDS-PAGE. Samples were electrophoresed in the presence or absence of 2-mercaptoethanol in gradient gels 4-20% 10 or 4-12% (Novex, Copenhagen, Denmark) and proteins were visualized by Coomassie staining (PhastGel Blue R, Amersham Pharmacia Biotech). Protein concentrations were determined with Coomassie Plus protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL) in 96-well plates with bovine serum albumin as standard according to the manufacturer's procedure.

15 Size exclusion chromatography was performed on a Superdex 200 PC 3.2/30 column (Amersham Pharmacia Biotech) using the SMART System (Amersham Pharmacia Biotech). The column was equilibrated at room temperature with a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 1 mM EDTA. Injection volume was 10 µl and samples were eluted at a flow rate of 0.1 ml/min. For column 20 calibration molecular weight markers Blue Dextran 2000 (~2000 kDa), thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa) and aldolase (158 kDa) from the Gel Filtration HMW Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech) was used.

25 N-terminal sequencing was performed on purified GST-SSAO and SSAO by repeated Edman degradation using a HP G1000A protein sequencer coupled to a HP 1090 PTH analyzer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). The GST-SSAO sample was desalted to remove glutathione prior to analysis. SSAO was taken from the flow-through of the glutathione-Sepharose column after cleavage.

30 A spectrophotometric assay for monoamine oxidases described by Holt and coworkers (Holt et al., 1997) was used to determine amine oxidase activity in samples from the different purification steps. The assay was performed in 96-well microtiter plates incubated at 37°C in a SPECTRAmax 250 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The reagent mix containing 1 mM vanillic acid (Sigma, St. Louis, MO), 500 µM 4-aminoantipyrine (Sigma), and 4U ml⁻¹ peroxidase (type VI from horseradish, Sigma) in 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.6) was

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

15

prepared on the same day assays were performed and kept at 5°C until used. Reactions were started by mixing 50 µl sample, 50 µl reagent mix and 200 µl potassium phosphate buffer with or without 750 µM benzylamine hydrochloride (Sigma) and were performed in triplicate. In order to obtain blank reference values, wells were analyzed with buffer added in place of sample. Absorbance changes were followed at 490 nm for 10-40 minutes. Standard curves were prepared with dilutions of a stock solution of H₂O₂ in potassium phosphate buffer ranging from 10 nmol/well to 120 nmol/well. When inhibition experiments were carried out, the samples were incubated in 300 µM semicarbazide at 37°C for 30 minutes, before addition of the benzylamine solution.

10

The invention will now be described with reference to the following examples. These are only intended to exemplify the invention and are not to be considered as limiting the scope of the invention in any way.

15

EXAMPLES

EXAMPLE 1: Cloning of SSAO cDNA

A PCR-strategy was used to amplify the gene of a human SSAO from human aorta cDNA. The PCR-primers were designed to include sequences flanking the human placenta amine oxidase gene (Zhang and McIntire, 1996) and to include restriction enzyme cleavage sites for cloning into different expression vectors. The ~2300 bp PCR-product was cloned and subsequent DNA-sequencing showed that the sequence of the cloned PCR-product was identical to the human placenta amine oxidase sequence (Zhang and McIntire, 1996) and to the VAP-1 sequence cloned from lung cDNA (Smith et al., 1998).

EXAMPLE 2: Purification of membrane-bound SSAO (Example for comparison)

Attempts to produce a recombinant SSAO protein showed that active SSAO could be produced in human embryo kidney (HEK293) cells using the pMB843 vector in which the entire coding sequence of human SSAO was cloned. Active protein was found after extraction using solubilizing agents, but only microgram amounts of protein could be partially purified.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

16

EXAMPLE 3: Rationale and design of a gene construct for expression of a soluble form of SSAO

An alternative strategy was developed for production of a non-membrane-bound SSAO in mammalian cells. Purification and detection were performed by replacing the 5 N-terminal region containing the putative membrane spanning peptide with an affinity fusion partner having an inherent dimerization propensity. The strategy also involved the use of a secretable affinity fusion partner to be able to secrete the fusion protein into the culture medium. A mutated variant of *S. japonicum* glutathione S-transferase (GST) was selected. This mutant GST retains its activity as well as its propensity to dimerize 10 and have been optimized for secretion (Tudyka and Skerra, 1997).

A protease cleavage site was designed to enable release of SSAO from the purified GST-SSAO fusion protein. Scanning of the predicted amino acid sequence revealed an arginine at position 28 flanked by three glycine residues. Several human proteases cleave after basic residues (Carter, 1990; Hooper et al., 1997) and short 15 stretches of glycine residues have been suggested to enhance accessibility to proteases (Carter, 1990). In addition, the proteolytic release of the extracellular region (shedding) of many membrane-anchored proteins into the blood stream occurs close to the membrane (Hooper et al., 1997). The glycine residue at position 29 was therefore chosen to be linked to a suitable substrate for site-specific proteolysis after purification 20 of the GST-SSAO fusion protein. Thus, a protease that can cleave a substrate having a glycine in the P1' position and having high specificity was desired. Several commercial proteases exist having these two properties such as factor Xa, thrombin, enterokinase and 3C protease (Nilsson et al., 1997). The ability to easily capture the protease after cleavage was another factor considered, leading to the selection of a commercially 25 available 3C protease fused to GST. The 3C protease cleavage site EALFQG (SEQ ID NO:6) (Miyashita et al., 1996; Wang et al., 1997) was introduced in the GST-SSAO fusion construct (Fig. 1).

The GST-SSAO fragment was cloned in frame with a signal sequence to achieve 30 secretion of the GST-SSAO fusion protein into the culture medium. A signal sequence derived from the heavy chain of a murine antibody was used (see Fig. 1). The final construct (SEQ ID NOS: 19 and 20) thus encoded a fusion protein comprising of an antibody signal peptide, an 18 amino acid spacer region, the mutated GST protein, a substrate sequence for the 3C protease and residues 29-763 of the human SSAO protein

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

17

cloned from human aorta cDNA (Fig. 1). The calculated molecular weight of the unmodified GST-SSAO fusion protein is 112 kDa.

EXAMPLE 4: Initial analyses on conditioned medium from HEK293 cells transfected
5 with the GST-SSAO expression vector

Benzylamine oxidase activity in the conditioned medium from small-scale cultures of HEK293 cells, stably transfected with the GST-SSAO expression vector pMB887, indicated that GST-SSAO was secreted into the culture medium. Further analyses showed that glutathione-Sepharose beads could be used to purify small amounts of the GST-SSAO fusion protein directly from the conditioned medium (data not shown), and that the purified material had benzylamine oxidase activity. Interestingly, the GST-SSAO fusion protein was found to be active also when immobilized on the glutathione-Sepharose beads. The amount of GST-SSAO fusion protein in the conditioned medium was calculated to be ~1 mg/l, by estimation of the amount of protein captured on the beads.

EXAMPLE 5: Preparative purification and site-specific cleavage of the GST-SSAO fusion protein

An overview of the affinity purification based procedure is shown in Fig. 2. The results of the purification are summarized in Table 1. One selected clone was expanded and grown in Cell Factories to generate larger amounts of GST-SSAO for purification. The harvested conditioned medium were concentrated and filtrated to reduce the time for loading on the glutathione-Sepharose column. Glutathione-affinity chromatography was then applied to purify the GST-SSAO fusion protein from the concentrated and filtered conditioned medium. Proteins captured on the column were eluted with 20 mM GSH and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. This showed that the GST-SSAO fusion protein had high purity and that it could be isolated from large amounts of other proteins in the culture medium in a single step. The GST-SSAO fusion protein migrated in level with the 116 kDa protein in the molecular weight marker. In total 8.8 mg of protein was recovered from the glutathione-Sepharose column. The specific activity of the GST-SSAO fusion protein was determined to $343 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Interestingly, the specific activity was almost doubled ($634 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) by the buffer exchange step which removed the reducing agent GSH.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

18

The glutathione-affinity purified GST-SSAO was cleaved with the GST-3C protease fusion protein (46 kDa) to remove the GST fusion partner from SSAO. Analytical experiments suggested that cleavage was slow, but precise, with no observable side-products. Moreover, complete cleavage could be obtained after ~48 hours incubation. The cleavage mixture was passed over the glutathione-Sepharose column to capture the removed GST fusion partner and the GST-3C protease. Flow-through material was collected and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions which showed only the expected SSAO product with a molecular weight of ~97 kDa. Captured material was also analyzed, which showed only the GST fusion partner (~28 kDa) and the GST-3C protease. This indicated that a complete cleavage had occurred and all GST containing proteins had been captured on the glutathione-Sepharose column. It also indicated that all SSAO protein had passed through the column since no SSAO protein was seen in the eluted material.

The specific activity of the purified SSAO protein was determined to 522 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹ which was less than the specific activity determined before cleavage. Since DTT had been used to ensure 3C protease activity during cleavage of the GST-SSAO fusion protein, we made an SDS-PAGE analysis (non-reducing) to see if the cleavage buffer had affected possible disulphide bridges in the SSAO homodimer (Kurkijärvi et al., 1998; Smith et al., 1998; Salminen et al., 1998). Only presumed SSAO monomers (~97 kDa) could be seen (data not shown). However, the SSAO protein was transformed to ~170 kDa in size (analyzed by SDS-PAGE) during storage at 5°C, indicating that one or several disulphides were formed. The cleavage buffer was removed by diafiltration and SDS-PAGE analysis showed that the SSAO protein was still apparently dimeric with a molecular weight of ~170 kDa. In total 3.6 mg of recombinant SSAO was obtained from 9.4 liters of conditioned medium having a specific activity of 809 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹. The overall yield in the process was 22 % based on determined benzylamine oxidase activity.

Interestingly, the GST fusion partner did not significantly affect the benzylamine oxidase activity of the SSAO protein. The specific activity of the purified GST-SSAO fusion protein after the buffer exchange step, was determined to 634 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹. After removal of the GST fusion partner, the specific activity of SSAO was determined to 809 nmol · min⁻¹ · mg⁻¹. However, the molecular mass of the GST fusion partner is ~25 % of the GST-SSAO fusion protein and the increase in specific activity after removal of GST was in the same range. This opens up possibilities to use the fusion

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

19

protein for enzyme characterization. Furthermore, an affinity fusion partner such as GST can be used to bind or immobilize a recombinant protein in a directed manner on solid supports to study e.g. protein-protein interactions and enzyme characteristics (Nilsson et al., 1997). The GST-SSAO fusion protein was indeed active when it was 5 bound to glutathione-Sepharose beads.

EXAMPLE 6: Initial characterization of purified SSAO proteins

A gel filtration experiment was performed to analyze the size of the SSAO protein under non-denaturing conditions. A sample from the SSAO protein material that 10 migrated as a dimeric protein when investigated by SDS-PAGE under non-reducing conditions was loaded on a calibrated analytical Superdex 200 column. The SSAO protein eluted at 1.29 ml, which was slightly faster than catalase (232 kDa), which eluted at 1.35 ml.

N-terminal amino acid sequencing of the purified SSAO protein showed that the 15 GST-3C protease had specifically cleaved the 3C protease substrate sequence EALFQG (SEQ ID NO:6) in the GST-SSAO fusion protein (Fig. 1). Twenty-nine amino acids were determined and corresponded exactly to residues number 29-58 in the predicted 20 SSAO amino acid sequence (SEQ ID NO:2). N-terminal sequencing was also performed on the GST-SSAO fusion protein, which showed that the signal peptide had been processed as anticipated.

Finally, the purified SSAO protein was found to be sensitive to inhibition by semicarbazide as expected. In the presence of 0.1 mM semicarbazide more than 95 % of the benzylamine oxidase activity was inhibited

TABLE I
Purification of recombinant human SSAO

Purification step (sample)	Total volume (ml)	Total protein (ng)	Total SSAO activity ^a (nmol min ⁻¹)	Specific activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Yield (%)
Conditioned medium	9400	9024	9243	1.0	—
Concentrated medium	600	9060	13200	1.5	100
Filtrate	850	9065	11900	1.3	90
GSH-affinity step-1 (eluate)	6.8	8.8	3029	343	23
Buffer exchange	15	8.9	5624 ^b	634 ^b	43
GSH-affinity step-2 (flow-through) ^c	36	5.5	2859	522	22
Dialfiltrate ^d	4.2	3.6	2919	809	22

^a Activity was measured as nmol of H₂O₂ produced per minute using 0.5 mM benzylamine as substrate. SSAO activity was confirmed with 0.1 mM semicarbazide as inhibitor.

^b Measured before addition of 5 mM DTT and GST-3C protease.

^c This step was performed after site-specific cleavage of the GST-SSAO fusion protein to capture removed GST fusion partner and GST-3C protease.

^d Buffer exchange and sample concentration by ultra-filtration.

WO 02/066669

21

PCT/SE02/00277

REFERENCES

- Blom, N., Hansen, J., Blaas, D. and Brunak, S. (1996) Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: Discovering cellular targets by neural networks. *Protein Science* 5, 2203-2216.
- Boomsma, F., van Veldhuisen, D. J., de Kam, P. J., Man in't Veld, A. J., Mosterd, A., Lie, K. I., and Schalekamp, M. A. (1997) Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc. Res.* 33(2), 387-391.
- Boomsma, F., van den Meiracker, A. H., Winkel, S., Aanstoot, H. J., Batstra, M. R., Man in 't Veld, A. J., and Bruining, G. J. (1999) Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in type I (insulin-dependent), in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis. *Diabetologia* 42(2), 233-237.
- Boor, P. J., and Hysmith, R. M. (1987) Allylamine cardiovascular toxicity. *Toxicology* 44(2), 129-145.
- Buffoni, F. (1993) Properties, distribution and physiological role of semicarbazide-sensitive amine oxidases. *Curr. Top. Pharmacol.* 2, 33-49.
- Callingham, B. A., Crosbie, A. E., and Rous, B. A. (1995) Some aspects of the pathophysiology of semicarbazide-sensitive amine oxidase enzymes. *Prog. Brain Res.* 106, 305-321.
- Carter, P. (1990) Site-specific proteolysis of fusion proteins. In *Protein purification: From molecular mechanism to large-scale processes* (Am. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 427) (Ladish, M. R., Willson, R. C., Painton, C. C., and Builder, S. E., eds), pp. 181-193, American Chemical Society Press.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

22

Castillo, V., Lizcano, J. M., Visa J., and Unzeta, M. (1998) Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) from human and bovine cerebrovascular tissues: biochemical and immunohistological characterization. *Neurochem. Int.* 33(5), 415-423.

5 Conklin, D. J., Langford, S. D., and Boor, P. J. (1998) Contribution of serum and cellular semicarbazide-sensitive amine oxidase to amine metabolism and cardiovascular toxicity. *Toxicol. Sci.* 46(2), 386-392.

Dwyer, M. A., Huang, A. J., Pan, C. Q., and Lazarus, R. A. Expression and 10 characterization of a DNase I-Fc fusion enzyme. (1999) *J. Biol. Chem.* 274(14), 9738-9743.

Ekbom, J. (1998) Potential therapeutic value of drugs inhibiting semicarbazide-sensitive amine oxidase: vascular cytoprotection in diabetes mellitus. *Pharmacol. Res.* 37(2), 87-92.

Gräshund, T., Nilsson, J., Lindberg, A. M., Uhlén, M., and Nygren, P. Å. (1997) 20 Production of a thermostable DNA polymerase by site-specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Expression Purif.* 9(1), 125-132.

Hartmann, C., and McIntire, W. S. (1997) Amine-oxidizing quinoproteins. *Methods Enzymol.* 280, 98-150.

Hollenbaugh, D., Chalupny, N. J., and Aruffo, A. (1992) Recombinant globulins: novel 25 research tools and possible pharmaceuticals. *Curr. Opin. Immunol.* 4(2), 216-219.

Holt, A., Sharman, D. F., Baker, G. B., and Palcic, M. M. (1997) A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 244(2), 384-392.

30 Holt, A., Alton, G., Scaman, C. H., Loppnow, G. R., Szpacenko, A., Svendsen, I., and Palcic, M. M. (1998) Identification of the quinone cofactor in mammalian semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochemistry* 37(14), 4946-4957.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

23

Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997) Membrane protein secretases. *Biochem J.* 321(Pt 2), 265-279.

Imamura, Y., Noda, S., Mashima, Y., Kudoh, J., Oguchi, Y., and Shimizu, N. (1998)

5 Human retina-specific amine oxidase: genomic structure of the gene (AOC2), alternatively spliced variant, and mRNA expression in retina. *Genomics* 51(2), 293-298.

Jaakkola, K., Kaunismaki, K., Tohka, S., Yegutkin, G., Vanttilinen, E., Havia, T., Pelliniemi, L. J., Virolainen, M., Jalkanen, S., and Salmi, M. (1999) Human vascular

10 adhesion protein-1 in smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* 155(6), 1953-1965.

Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S., and Foeller, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service National Institutes of Health) NIH Publication

15 No. 91-3242.

Kurkijärvi, R., Adams D. H., Leino R., Mottonen T., Jalkanen S., and Salmi, M. (1998) Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): Increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J. Immunol.* 161; 1549-1557.

20 Larsson, L. N., Johansson, C., Lindholm, L., and Holmgren, J. (1988) Mouse monoclonal antibodies for experimental immunotherapy promotes killing of tumor cells. *Int. J. Cancer* 42, 877-882.

25 Lewinsohn, R. (1984) Mammalian monoamine-oxidizing enzymes, with special reference to benzylamine oxidase in human tissues. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 17(3-4), 223-256.

30 Liang, J. F., Li, Y. T., and Yang, V. C. (2000) Biomedical application of immobilized enzymes. *J. Pharm. Sci.* 89(8), 979-990.

Linder, M., Nevanen, T., Söderholm, L., Bengs, O., and Teeri, T. T. (1998) Improved immobilization of fusion proteins via cellulose-binding domains. *Biotechnol. Bioeng.* 60(5), 642-647.

- Lim, K., Ho, J. X., Keeling, K., Gilliland, G. L., Ji, X., Ruker, F., and Carter, D. C. (1994) Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci.* 3(12), 2233-2244.
- Lo, K. M., Sudo, Y., Chen, J., Li, Y., Lan, Y., Kong, S. M., Chen, L., An, Q., and Gillies, S. D. (1998) High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng.* 11(6), 495-500.
- Lyles, G. A. (1996) Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(3), 259-274.
- 15 Lyles, G. A., and Pino, R. (1998) Properties and functions of tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases in isolated cell preparations and cell cultures. *J. Neural. Transm. Suppl.* 52, 239-250.
- 20 Meszaros, Z., Karadi, I., Csanyi, A., Szombathy, T., Romics, L., and Magyar, K. (1999) Determination of human serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: a possible clinical marker of atherosclerosis. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 24(4), 299-302.
- Miyashita, K., Okunishi, J., Utsumi, R., Komano, T., Tamura, T., and Satoh, N. (1996) Cleavage specificity of coxsackievirus 3C proteinase for peptide substrate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(4), 705-707.
- 25 Morris, N. J., Ducret, A., Aebersold, R., Ross, S. A., Keller, S.R., and Lienhard, G. E. (1997) Membrane amine oxidase cloning and identification as a major protein in the adipocyte plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 9388-9392.
- 30 Müller, K. M., Arndt, K. M., and Alber, T. (2000) Protein fusions to coiled-coil domains. *Methods Enzymol.* 328, 261-282.

WO 02/066669

25

PCT/SE02/00277

Nakos, G., and Gossrau, R. (1994) Light microscopic visualization of semicarbazide-sensitive amine oxidase (benzylamine oxidase) using a cerium method. *Folia Histochem. Cytobiol.* 32(1), 3-10.

5 Nilsson, J., Larsson, M., Ståhl, S., Nygren, P. Å., and Uhlén, M. (1996) Multiple affinity domains for the detection, purification and immobilization of recombinant proteins. *J. Mol. Recognit.* 9(5-6), 585-594.

Nilsson, J., Ståhl S., Lundeberg J., Uhlén M., and Nygren, P. Å. (1997) Affinity fusion 10 strategies for detection, purification and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expression Purif.* 11, 1-16.

Nord, K., Gunnarsson, E., Ringdahl, J., Ståhl, S., Uhlén, M., and Nygren, P. Å. (1997) Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial 15 receptor domain. *Nat. Biotechnol.* 15(8), 772-777.

Nygren, P. Å., and Uhlén, M. (1997) Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7(4), 463-469.

20 Rieker, J. D., and Hu, J. C. (2000) Molecular applications of fusions to leucine zippers. *Methods Enzymol.* 328, 282-296.

Sakurai, T., Roonprapunt, C., and Grumet, M. (1998) Purification of Ig-fusion proteins from medium containing Ig. *Biotechniques* 25(3), 382-385.

25 Saleemuddin M (1999) Bioaffinity based immobilization of enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 64, 203-226.

30 Salminen, T. A., Smith, D. J., Jalkanen, S., and Johnson, M. S. (1998) Structural model of the catalytic domain of an enzyme with cell adhesion activity: human vascular adhesion protein-1 (HVAP-1) D4 domain is an amine oxidase. *Protein Eng.* 11(12), 1195-204.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

26

Sheibani, N. (1999) Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins. *Prep. Biochem. & Biotechnol.* 29, 77-90.

Shpigel, E., Goldlust, A., Efroni, G., Avraham, A., Eshel, A., Dekel, M., and Shoseyov, O. (1999) Immobilization of recombinant heparinase I fused to cellulose-binding domain. *Biotechnol. Bioeng.* 65(1), 17-23.

Skerra, A. (2000) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 13(4), 167-187.

10

Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.

15

Smith, D. J., Salmi, M., Bono, P., Heilman, J., Leu, T., and Jalkanen, S. (1998) Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 188, 17-27.

Tischer, W., and Kasche, V. (1999) Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17(8), 326-335.

20

Tomme, P., Boraston, A., McLean, B., Kormos, J., Creagh, A. L., Sturch, K., Gilkes, N. R., Haynes, C. A., Warren, R. A., and Kilburn, D. G. (1998) Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 715(1), 283-296.

25

Tudyka, T., and Skerra, A. (1997) Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 6, 2180-2187.

30

Turkova, J. (1999) Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 722(1-2), 11-31.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

27

Uhlén, M., Forsberg, G., Moks T., Hartmanis, M., and Nilsson, B. (1992) Fusion proteins in Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 363-369.

Wang, Q. M., Johnson, R. B., Cox, G. A., Villarreal, E. C., and Loncharich, R. J. (1997)

5 A continuous colorimetric assay for rhinovirus-14 3C protease using peptide p-nitroamides as substrates. *Anal. Biochem.* 252(2), 238-245.

Walker, P.A., Leong, L. E., Ng, P. W., Tan, S. H., Waller, S., Murphy, D., and Porter, A. G. (1994) Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant

10 fusion proteases. *Bio/Technology* 12, 601-605.

Wimmerova, M., and Macholan, L. (1999) Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation. *Biosens. Bioelectron.* 14(8-9), 695-702.

15 Yu, P. H. and Zuo, D. M. (1993) Oxidative deamination of methylamine by semicarbazide-sensitive amine oxidase leads to cytotoxic damage in endothelial cells. Possible consequences for diabetes. *Diabetes* 42(4), 594-603.

20 Yu, P. H., Zuo, D. M., and Davis, B. A. (1994) Characterization of human serum and umbilical artery semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO). Species heterogeneity and stereoisomeric specificity. *Biochem. Pharmacol.* 47(6), 1055-1059.

Zhang, X., Kim, J., and McIntire, W. S. (1995) cDNA sequences of variant forms of 25 human placenta diamine oxidase. *Biochem. Genet.* 33(7-8), 261-268.

Zhang, X and McIntire, W. S. (1996) Cloning and sequencing of a copper-containing, topa quinone-containing monoamine oxidase from human placenta. *Gene* 179, 279-286.

CLAIMS

1. A nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding a secreted fusion protein comprising:

- 5 (i) a signal peptide that directs secretion of the fusion protein from a host cell;
- (ii) a soluble form of human semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO);
- (iii) a fusion partner that enables dimerization of the soluble form of human SSAO; and
- 10 (iv) a protease cleavage site located between the soluble form of human SSAO and the fusion partner.

2. The nucleic acid according to claim 1, wherein the soluble form of human SSAO comprises amino acids 29 to 763 of SEQ ID NO: 2 or a fragment thereof.

15 3. The nucleic acid according to claim 2, wherein the fusion protein has benzylamine oxidase activity.

4. The nucleic acid according to claim 2, wherein the soluble form of human SSAO comprises amino acids 29 to 763 of SEQ ID NO: 2.

20 5. The nucleic acid according to claim 1, wherein the fusion protein lacks the membrane spanning portion of human SSAO.

25 6. The nucleic acid according to claim 1, wherein the fusion protein lacks amino acids 6 to 26 of SEQ ID NO: 2.

7. The nucleic acid according to claim 1, wherein the fusion partner is fused to the N-terminal portion of the soluble form of human SSAO.

30 8. The nucleic acid according to claim 1, wherein the fusion partner is glutathione S-transferase or a functionally equivalent variant thereof.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

29

9. The nucleic acid according to claim 8, wherein the fusion partner is a variant of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase, the variant having at least one of the cysteine residues in positions 85, 138, and 178 replaced by another amino acid residue.

5 10. The nucleic acid according to claim 8, wherein the fusion partner comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5.

11. The nucleic acid according to claim 1, wherein the signal peptide is a mouse IgG1 heavy chain signal peptide.

10 12. The nucleic acid according to claim 1, wherein the protease cleavage site is a 3C protease cleavage site.

13. The nucleic acid according to claim 12, wherein the 3C protease cleavage site 15 comprises the amino acid sequence EALFQG (SEQ ID NO: 6).

14. The nucleic acid according to claim 1, wherein the fusion protein comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20.

20 15. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 1.

16. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 14.

17. A method for the purification of a recombinant human SSAO, the method 25 comprising:

(i) transfecting a cell with the expression vector according to claim 15;
(ii) culturing the cell in a culture medium and under conditions wherein the fusion protein encoded by the expression vector is secreted into the culture medium;
(iii) binding the secreted fusion protein to a ligand having affinity for the fusion 30 partner;
(iv) separating the fusion partner and the soluble form of human SSAO; and
(v) recovering the soluble form of human SSAO.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

30

18. The method according to claim 17, wherein the ligand having affinity for the fusion partner is glutathione or a derivative thereof.

19. The method according to claim 17, wherein the fusion partner is separated from the soluble form of human SSAO by protease cleavage.

20. The method according to claim 19, wherein the protease is a picornavirus 3C-protease.

10 21. The method according to claim 20, wherein the protease is rhinovirus 3C-protease.

22. The method according to claim 19, wherein the protease is fused to a fusion partner resulting in a fusion protease.

15 23. The method according to claim 22, wherein the fusion protease is separated from the soluble form of human SSAO by a process comprising binding the fusion protease to a ligand having affinity for the fusion protease.

20 24. A method for the preparation of an immobilized recombinant human SSAO, the method comprising:

- (i) transfecting a cell with the expression vector according to claim 15;
- (ii) culturing the cell in a culture medium and under conditions wherein the fusion protein encoded by the expression vector is secreted into the culture medium; and
- 25 (iii) binding the secreted fusion protein to a ligand having affinity for the fusion partner to thereby immobilize the fusion protein.

25. A fusion protein encoded by the nucleic acid of claim 1.

30 26. The fusion protein of claim 25, wherein the fusion protein is immobilized on a ligand having affinity for the fusion partner.

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

1/3

一
五

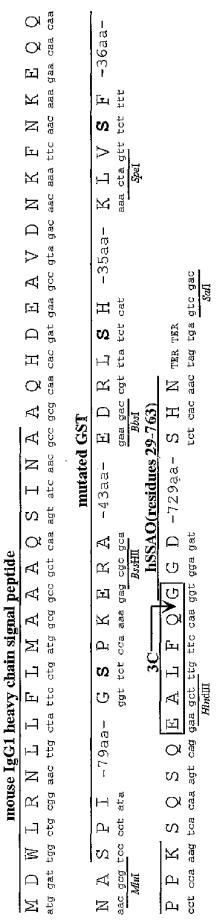
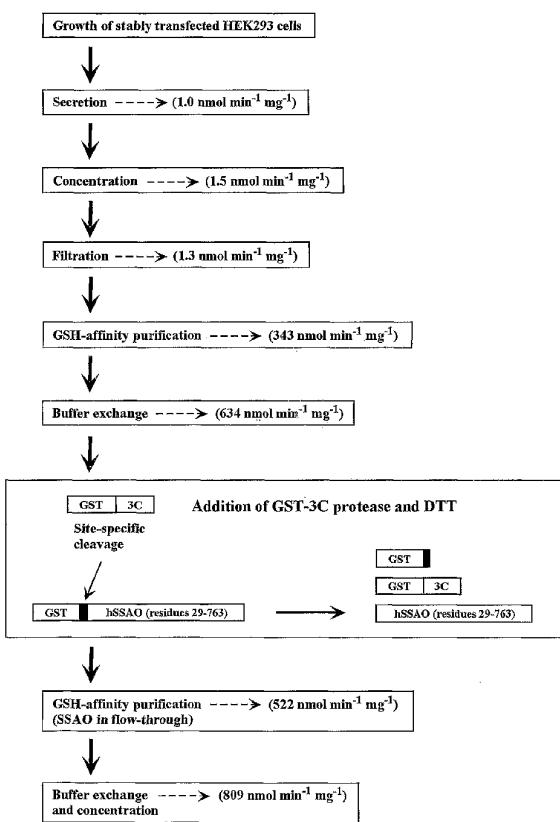


Fig. 2

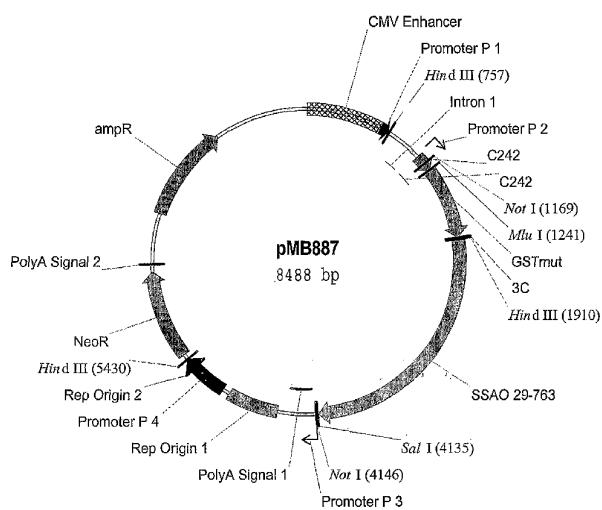


WO 02/066669

PCT/SE02/00277

3/3

Fig. 3



WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Biocvitrum AB

<120> Methods for protein purification

<130> 00395

<160> 20

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 4040

<212> DNA

<213> human

<220>

<221> CDS

<222> (161)..(2452)

<300>

<308> GenBank/NM_003734

<309> 2000-01-28

<300>

<308> GenBank/U39447

<309> 1997-01-08

<400> 1
 gtccttcca cccttagtcc caggcatctg actaccggga acctcagcca gagtcggga 60
 gccccccacc ccgcccaggaa gccaacagag ccccccgtttt gctggcgatga gaatacattt 120
 ctctcccttg gtgtaatcag ctgtccctct tctgtggaaa atg aac cag aag aca 175
 Met Asn Gln Lys Thr
 1 5
 atc ctc gtg ctc ctc att ctg gcc gtc atc acc atc ttt gcc ttg gtt 223
 Ile Leu Val Leu Ile Leu Ala Val Ile Thr Ile Phe Ala Leu Val
 10 15 20
 tgt gtc ctg ctg gtc agg ggt gga gat ggg ggt gaa ccc agc cag 271
 Cys Val Leu Val Gly Arg Gly Asp Gly Glu Pro Ser Gln
 25 30 35
 ctt ccc cat tgc ccc tat gta tct ccc agt gcc cag cct tgg aca cac 319
 Leu Pro His Cys Pro Ser Val Ser Pro Ala Gln Pro Trp Thr His
 40 45 50
 cct ggc cag agc cag ctg ttt gca gac ctg agc cga gag gag ctg acg 367
 Pro Gly Gln Ser Gln Leu Phe Ala Asp Leu Ser Arg Glu Glu Leu Thr
 55 60 65
 gct stg atg cgc ttt ctg acc cag cgg ctg ggg cca ggg ctg stg gat 415
 Ala Val Met Arg Phe Leu Thr Gln Arg Leu Gly Pro Gly Leu Val Asp
 70 75 80 85
 gca gcc cag gcc cgg ccc tcc gac aac tgt gtc ttc tca gtg gag ttg 463

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 2 -

Ala Ala Gln Ala Arg Pro Ser Asp Asn Cys Val Phe Ser Val Glu Ieu	
90	95
cag ctg cct ccc aag gct gca gcc ctg got cac ttg gac agg egg agg	511
Gln Leu Pro Pro Lys Ala Ala Ieu Ala His Leu Asp Arg Gly Ser	
105	110
ccc cca cct gcc cgg gag gca ctg gcc atc gtc ttc ttt ggc agg caa	559
Pro Pro Pro Ala Arg Glu Ala Ieu Ala Ile Val Phe Phe Gly Arg Gln	
120	125
ccc cag ccc aac gtg agt gag ctg gtg ggg cca ctg cct cac ccc	607
Pro Gln Pro Asn Val Ser Glu Leu Val Val Gly Pro Leu Pro His Pro	
135	140
tcc tac atg cgg gac gtg act gtg gag cgt cat gga ggc ccc ctg ccc	655
Ser Tyr Met Arg Asp Val Thr Val Glu Arg His Gly Gly Pro Leu Pro	
150	155
tat cac cga cgc ccc gtg ctg ttccaa gag tac ctg gac ata gac cag	703
Tyr His Arg Arg Pro Val Leu Phe Gln Glu Tyr Leu Asp Ile Asp Gln	
170	175
atg atc ttc aac aga gag ctg ccc cag gct tct tgg ctt ctc cac cac	751
Met Ile Phe Asn Arg Glu Ieu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Leu His His	
185	190
tgt tgc ttc tac aag cac cgg gga cgg aac ctg gtg aca atg acc acg	799
Cys Cys Phe Tyr Lys His Arg Gly Arg Asn Leu Val Thr Met Thr Thr	
200	205
gct ccc cgt ggt ctg caa tca ggg gac cgg gco acc tgg ttt ggc ctc	847
Ala Pro Arg Gly Leu Gln Ser Gly Asp Arg Ala Thr Trp Phe Gly Leu	
215	220
tac tac aac atc tgg ggo gct ggg ttc ctg cac cac gtg ggc ttg	895
Tyr Tyr Asn Ile Ser Gly Ala Gly Phe Phe Leu His His Val Gly Leu	
230	235
gag ctg cta gtg aac cac aag gcc ctt gac cct gcc cgc tgg act atc	943
Glu Leu Leu Val Asn His Lys Ala Leu Asp Pro Ala Arg Trp Thr Ile	
250	255
cag aag gtg ttc tat caa ggc cgc tac tac gac agc ctg gcc cag ctg	991
Gln Lys Val Phe Tyr Gln Gly Arg Tyr Tyr Asp Ser Leu Ala Gln Leu	
265	270
gag gcc cag ttt ggg gcc ggc ctg gtg aat gtg gtg ctg atc cca gac	1039
Glu Ala Gln Phe Glu Ala Gly Leu Val Asn Val Val Leu Ile Pro Asp	
280	285
aat ggc aca ggt ggg tcc tgg tcc ctg aag tcc cct gtg ccc cgg ggt	1087
Asn Gly Thr Gly Gly Ser Trp Ser Leu Lys Ser Pro Val Pro Pro Gly	
295	300
cca gct ccc cct cta cag ttc tat ccc caa ggc ccc cgc ttc agt gtc	1135
Pro Ala Pro Pro Leu Gln Phe Tyr Pro Gln Gly Pro Arg Phe Ser Val	
310	315
cag gga agt cga gtg gcc tcc tca ctg tgg act ttc tcc ttt ggc ctc	1183
Gln Gly Ser Arg Val Ala Ser Ser Leu Trp Thr Phe Ser Phe Gly Leu	

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

-3-

	330	335	340	
gga gca ttc agt ggc cca agg atc ttt gac gtt cgc ttc caa gga gaa Gly Ala Phe Ser Gly Pro Arg Ile Phe Asp Val Arg Phe Gln Gly Glu	345	350	355	1231
aga cta gtt tat gag ata agc ctc caa gag gcc ttg gcc atc tat ggt Arg Leu Val Tyr Glu Ile Ser Leu Gln Glu Ala Leu Ala Ile Tyr Gly	360	365	370	1279
gga aat tcc oca gca gca atg acc acc cgc tat gtg gat gga ggc ttt Gly Asn Ser Pro Ala Ala Met Thr Thr Arg Tyr Val Asp Gly Gly Phe	375	380	385	1327
ggc atg ggc aag tac acc acg ccc ctg acc cgt ggg gtg gac tgc ccc Gly Met Cys Tyr Thr Pro Leu Thr Arg Gly Val Asp Cys Pro	390	395	400	1375
tac ttg gcc acc tac gtg gac tgg cac ttc ctt ttg gag tcc cag gcc Tyr Leu Ala Thr Tyr Val Asp Trp His Phe Leu Leu Glu Ser Gln Ala	410	415	420	1423
ccc aag aca ata cgt gat gcc ttt tgt gtc ttt gaa cag aac cag ggc Pro Lys Thr Ile Arg Asp Ala Phe Cys Val Phe Glu Gln Asn Gln Gly	425	430	435	1471
ctc ccc ctg cgg cga cac cac tca gat ctc tac tgg cac tac ttt ggg Leu Pro Leu Arg Arg His His Ser Asp Leu Tyr Ser His Tyr Phe Gly	440	445	450	1519
ggc ctt gcg gaa acg gtg ctg gtc gtc aga tct atg tcc acc ttg ctc Gly Leu Ala Glu Thr Val Leu Val Val Arg Ser Met Ser Thr Leu Leu	455	460	465	1567
aac tat gac tat gtg tgg gat acg gtc ttc cac ccc agt ggg gcc ata Asn Tyr Asp Tyr Val Trp Asp Thr Val Phe His Pro Ser Gly Ala Ile	470	475	485	1615
gaa ata cga ttc tat gcc acg ggc tac atc acg tcg gca ttc ctc ttt Glu Ile Arg Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Ile Ser Ser Ala Phe Leu Phe	490	495	500	1663
ggc gct act ggg aag tac ggg aac caa gtg tca gag cac acc ctg ggc Gly Ala Thr Gly Lys Asn Gln Val Ser Glu His Thr Leu Gly	505	510	515	1711
acg gtc cac acc cac acg gcc cac ttc aag ctg gat ctg gat gta gca Thr Val His Thr His Ser Ala His Phe Lys Val Asp Leu Asp Val Ala	520	525	530	1759
gga ctg gag aac tgg gtc tgg gcc gag gat atg gtc ttt gtc ccc atg Gly Leu Glu Asn Trp Val Trp Ala Glu Asp Met Val Phe Val Pro Met	535	540	545	1807
gtt gtg ccc tgg aac ctt gag cac cag ctg cag agg ctg cag gtg acc Ala Val Pro Trp Ser Pro Glu His Gln Leu Gln Arg Leu Gln Val Thr	550	555	560	1855
cgg aag ctg ctg gag atg gag gag cag gcc gtc ctc gtg gga agc Arg Lys Leu Leu Glu Met Glu Glu Gln Ala Ala Phe Leu Val Gly Ser	570	575	580	1903

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 4 -

gcc acc cct cgc tac ctg tac ctg gcc agc aac cac agc aac aag tgg Ala Thr Pro Arg Tyr Leu Tyr Leu Ala Ser Asn His Ser Asn Lys Trp 585 590 595	1951
ggc cac ccc cgg ggc tac cgc atc cag atg ctc agc ttt gct gga gag Gly His Pro Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Met Leu Ser Phe Ala Gly Glu 600 605 610	1999
ccg ctg ccc caa aac agc tcc atg gcg aga ggc ttc agc tgg gag agg Pro Leu Pro Gln Asn Ser Met Ala Arg Gly Phe Ser Trp Glu Arg 615 620 625	2047
tac cag ctg gct gtg acc cag cgg aag gag gag gag ccc agt agc agc Tyr Gln Leu Ala Val Thr Gln Arg Lys Glu Glu Glu Pro Ser Ser 630 635 640 645	2095
agc gtt ttc aat cag aat gag cct tgg gcc ccc act gtg gat ttc agt Ser Val Phe Asn Gln Asn Asp Pro Trp Ala Pro Thr Val Asp Phe Ser 650 655 660	2143
gac ttc atc aac aat gag acc att gct gga aag gat ttg gtg gcc tgg Asp Phe Ile Asn Asn Glu Thr Ile Ala Gly Lys Asp Leu Val Ala Trp 665 670 675	2191
gtg aca gct ggt ttt ctg cat atc cca cat gca gag gac att cct aac Val Thr Ala Gly Phe Leu His Ile Pro His Ala Glu Asp Ile Pro Asn 680 685 690	2239
aca gtg act gtg ggg aac ggc gtg ggc ttc ttc ctc cga ccc tat aac Thr Val Thr Val Gly Asn Gly Val Gly Phe Leu Arg Pro Tyr Asn 695 700 705	2287
tcc ttt gac gaa gac ccc tcc ttc tac tat gcc gac tcc atc tac ttc Phe Phe Asp Glu Asp Pro Ser Phe Tyr Ser Ala Asp Ser Ile Tyr Phe 710 715 720 725	2335
cga ggg gac cag gat gct ggg gcc tgc gag gtc aac ccc cta gct tgc Arg Gly Asp Gln Asp Ala Gly Ala Cys Glu Val Asn Pro Leu Ala Cys 730 735 740	2383
ctg ccc cag gct gct gcc tgt gcc ccc gac ctc cct gcc ttc tcc cac Leu Pro Gln Ala Ala Ala Cys Ala Pro Asp Leu Pro Ala Phe Ser His 745 750 755	2431
ggg ggc ttc tct cac aac tag gcgggtctgg gatggggcat gtggccaagg Gly Gly Phe Ser His Asn 760	2462
gctccaggcc cagggtgtga gggatgggaa gcagctgggc actggggccgg cagcctggtt ccctctttcc tggccaggaa ctctctttcttccactaccc tccctcgcattt ccgcctcttgc gccaggagcc tcctgaccctt gtatgccttgc acacaggggaa cactgaacctt tggttgatgcc agctgtactg agtttctatc cacaaggccc aggcattggcc cagcctggag ccgtggccca gggccttccat agatgggttcc ctgggttgc ttgtggctttt cccgaatctt tttagggcac ctccaaaggac tctaaaaggg ggttatcccc tggagacccc agagtagggt tgccagttt	2542 2602 2662 2722 2782 2842

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

5

caaggatccat	agctgagtcgtg	gaaaggatgc	tctcgctc	atcccattc	atccaggatcc	2902
tttcccttc	gttccctct	cttcaccca	cttccttc	cttcctctgt	tcttgcccte	2962
tcttctatcc	tgcaatttct	ccggaaatctt	gagggatat	coctatgtcc	cagccccctgg	3022
tactccccca	gccttcagg	ttcaagtcaag	tccgttc	tttccagccc	tatggaaatc	3082
tcaaggatcc	ggggaccctt	atccagatgg	ccatccctg	tgtgtccgtt	ccttgcgtct	3142
gttgtcttt	ggggatggta	gttgtctcta	ccctgtct	ggggctgggt	gtgtttcagg	3202
acagctgttt	ctgtgcattt	gtgttcgtct	gcctcatgt	ctctataagag	gaggatggtc	3262
atcgtgcacag	cagcagctca	agtttagcatt	tcaagtgatt	tgggggtgcga	atgataatga	3322
agaatggcca	ttttgtacca	gggtctgtta	tttcgtcaaca	gcctgttttg	ggggctggag	3382
tggaaacaaa	gggtggccat	caaagatgg	aagccaaacg	coctacaact	ccagccaccc	3442
agccaggagg	gggtgtccaa	tcacatttcg	qcattcgat	gagctggggc	ctgggtggagg	3502
tgggggtctg	gcctagtggg	gaggggctcg	gcctgggtgg	ggcaggccct	ggcctggcc	3562
aggcgttggcc	tccattccca	tcactgtgt	ccctccgtag	gtctggatgg	gggatggggga	3622
caaagaataa	gcaagagatgg	agaacaaaca	gaaactttt	tctctaaagg	actgtgtaaa	3682
tcaatttcgt	tcacaggctta	caataacaata	gtatgcacgt	aaaaataata	tgtatgttt	3742
tatatactaa	tatgtataataa	tcttcagggt	aaaaaggca	gocacagaaa	tgtgtatagc	3802
gcacttccca	tttgtgtttc	agaaaggagt	agaatataaa	cacataattt	cttatgtatg	3862
cttattcaga	ataaaatgggt	aacactgttt	acttttggga	ggggaccacag	taggttgagg	3922
acaggagagg	gaagggtctt	aacacttaca	cccttttgc	cattttgaat	tttgcacccat	3982
gtgactgtat	taccttattca	aaataacaa	taaatggcc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	4040

<210> 2
<211> 763
<212> PRT
<213> butane

```

<400> 2
Met Asn Gln Lys Thr Ile Leu Val Leu Leu Ile Leu Ala Val Ile Thr
1          5           10          15

```

Ile Phe Ala Leu Val Cys Val Leu Leu Val Gly Arg Gly Gly Asp Gly
20 25 30

Gly Glu Pro Ser Gln Leu Pro His Cys Pro Ser Val Ser Pro Pro Ser Ala
35 40 45

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 6 -

Arg Glu Glu Leu Thr Ala Val Met Arg Phe Leu Thr Gln Arg Leu Gly
65 70 75 80

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

Phe Ser Val Glu Leu Gln Leu Pro Pro Lys Ala Ala Ala Leu Ala His
 100 105 110

Leu Asp Arg Gly Ser Pro Pro Pro Ala Arg Glu Ala Leu Ala Ile Val
115 120 125

Phe Phe Gly Arg Gln Pro Gln Pro Asn Val Ser Glu Leu Val Val Gly
130 135 140

Pro Leu Pro His Pro Ser Tyr Met Arg Asp Val Thr Val Glu Arg His
 145 150 155 160

Gly Gly Pro Leu Pro Tyr His Arg Arg Pro Val Leu Phe Gln Glu Tyr
165 170 175

. Leu Asp Ile Asp Gln Met Ile Phe Asn Arg Glu Leu Pro Gln Ala Ser
180 185 190

Gly Leu Leu His His Cys Cys Phe Tyr Lys His Arg Gly Arg Asn Leu
195 200 205

Val Thr Met Thr Thr Ala Pro Arg Gly Leu Gln Ser Gly Asp Arg Ala
210 215 220

Thr Trp Phe Gly Leu Tyr Tyr Asn Ile Ser Gly Ala Gly Phe Phe Leu
225 230 235 240

His His Val Gly Leu Glu Leu Leu Val Asn His Lys Ala Leu Asp Pro
245 250 255

Ala Arg Trp Thr Ile Gln Lys Val Phe Tyr Gln Gly Arg Tyr Tyr Asp
260 265 270

Ser Leu Ala Gln Leu Glu Ala Gln Phe Glu Ala Gly Leu Val Asn Val
375 380 385

Val Leu Ile Pro Asp Asn Gly Thr Gly Gly Ser Trp Ser Leu Lys Ser
220 225 230

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 7 -

Pro Val Pro Pro Gly Pro Ala Pro Pro Leu Gln Phe Tyr Pro Gln Gly
 305 310 315 320

Pro Arg Phe Ser Val Gln Gly Ser Arg Val Ala Ser Ser Leu Trp Thr
 325 330 335

Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Phe Ser Gly Pro Arg Ile Phe Asp Val
 340 345 350

Arg Phe Gln Gly Glu Leu Val Tyr Glu Ile Ser Leu Gln Glu Ala
 355 360 365

Leu Ala Ile Tyr Gly Gly Asn Ser Pro Ala Ala Met Thr Thr Arg Tyr
 370 375 380

Val Asp Gly Gly Phe Gly Met Gly Lys Tyr Thr Thr Pro Leu Thr Arg
 385 390 395 400

Gly Val Asp Cys Pro Tyr Leu Ala Thr Tyr Val Asp Trp His Phe Leu
 405 410 415

Leu Glu Ser Gln Ala Pro Lys Thr Ile Arg Asp Ala Phe Cys Val Phe
 420 425 430

Glu Gln Asn Gln Gly Leu Pro Leu Arg Arg His His Ser Asp Leu Tyr
 435 440 445

Ser His Tyr Phe Gly Gly Leu Ala Glu Thr Val Leu Val Val Arg Ser
 450 455 460

Met Ser Thr Leu Leu Asn Tyr Asp Tyr Val Trp Asp Thr Val Phe His
 465 470 475 480

Pro Ser Gly Ala Ile Glu Ile Arg Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Ile Ser
 485 490 495

Ser Ala Phe Leu Phe Gly Ala Thr Gly Lys Tyr Gly Asn Gln Val Ser
 500 505 510

Glu His Thr Leu Gly Thr Val His Thr His Ser Ala His Phe Lys Val
 515 520 525

Asp Leu Asp Val Ala Gly Leu Glu Asn Trp Val Trp Ala Glu Asp Met
 530 535 540

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

-8-

Val Phe Val Pro Met Ala Val Pro Trp Ser Pro Glu His Gln Leu Gln
 545 550 555 560

Arg Leu Gln Val Thr Arg Lys Leu Leu Glu Met Glu Glu Gln Ala Ala
 565 570 575

Phe Leu Val Gly Ser Ala Thr Pro Arg Tyr Leu Tyr Leu Ala Ser Asn
 580 585 590

His Ser Asn Lys Trp Gly His Pro Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Met Leu
 595 600 605

Ser Phe Ala Gly Glu Pro Leu Pro Gln Asn Ser Ser Met Ala Arg Gly
 610 615 620

Phe Ser Trp Glu Arg Tyr Gln Leu Ala Val Thr Gln Arg Lys Glu Glu
 625 630 635 640

Glu Pro Ser Ser Ser Val Phe Asn Gln Asn Asp Pro Trp Ala Pro
 645 650 655

Thr Val Asp Phe Ser Asp Phe Ile Asn Asn Glu Thr Ile Ala Gly Lys
 660 665 670

Asp Leu Val Ala Trp Val Thr Ala Gly Phe Leu His Ile Pro His Ala
 675 680 685

Glu Asp Ile Pro Asn Thr Val Thr Val Gly Asn Gly Val Gly Phe Phe
 690 695 700

Leu Arg Pro Tyr Asn Phe Phe Asp Glu Asp Pro Ser Phe Tyr Ser Ala
 705 710 715 720

Asp Ser Ile Tyr Phe Arg Gly Asp Gln Asp Ala Gly Ala Cys Glu Val
 725 730 735

Asn Pro Leu Ala Cys Leu Pro Gln Ala Ala Ala Cys Ala Pro Asp Leu
 740 745 750

Pro Ala Phe Ser His Gly Gly Phe Ser His Asn
 755 760

<210> 3
<211> 739
<212> DNA
<213> S. japonicum

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 9 -

<220>
<221> CDS
<222> (17) . . (673)

<300>
<308> GenBank/M14654
<309> 1994-03-14

<400> 3
 ttttagtaac ttggc atg tcc cct ata cta ggt tat tgg aaa att aag ggc
 Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly 52
 1 5 10
 ctt gtg caa ccc act cga ctt ctt ttg gaa tat ctt gaa gaa aaa tat
 100
 Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Gly Lys Tyr
 15 20 25
 148
 gaa gag cat ttg tat gag cgc gat gaa ggt gat aaa tgg cga aac aaa
 148
 Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys
 30 35 40
 196
 aag ttt gaa ttg ggt ttg gag ttt ccc aat ctt cct tat tat att gat
 196
 Lys Phe Glu Leu Gly Lys Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp
 45 50 55 60
 244
 ggt gat gtt aaa tta aca cag tct atg gcc atc ata cgt tat ata gct
 244
 Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala
 65 70 75
 292
 gac aag cac aac atg ttg ggt ggt tgc cca aaa gag cgt gca gag att
 292
 Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile
 80 85 90
 340
 tca atg ctt gaa gga gcg gtt ttg gat att aga tac ggt gtt ttg aga
 340
 Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg
 95 100 105
 388
 att gca tat agt aaa gac ttt gaa act ctc aaa gtt gat ttt ctt agc
 388
 Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser
 110 115 120
 436
 aag cta cct gaa atg ctg aaa atg ttc gaa gat cgt tta tgt cat aaa
 436
 Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys
 125 130 135 140
 484
 aca tat tta aat ggt gat cat gta acc cat cct gac ttc atg ttg tat
 484
 Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr
 145 150 155
 532
 gac gct ctt gat gtt gtt tta tac atg gag cca atg tgc ctg gat gcg
 532
 Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Ile Asp Ala
 160 165 170
 580
 ttc cca aaa tta gtt tgt ttt aaa aaa cgt att gaa gct atc cca caa
 580
 Phe Pro Lys Leu Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln
 175 180 185
 628
 att gat aag tac ttg aaa tcc agc aag tat ata gca tgg cct ttg cag
 628
 Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln
 190 195 200

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 10 -

ggc tgg caa gcc acg ttt ggt ggt ggc gac cat cct cca aaa taa	673
Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Asp His Pro Pro Lys	
205 210 215	
atataagaatg attgttttag taaacattat ttatcaactt caatcaaact aaatataaat	733
gtcgac	739
<210> 4	
<211> 218	
<212> PRT	
<213> S.japonicum	
<400> 4	
Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro	
1 5 10 15	
Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu	
20 25 30	
Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu	
35 40 45	
Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys	
50 55 60	
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn	
65 70 75 80	
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu	
85 90 95	
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser	
100 105 110	
Ilys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu	
115 120 125	
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn	
130 135 140	
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp	
145 150 155 160	
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu	
165 170 175	
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr	
180 185 190	

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 11 -

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205

Thr Phe Gly Gly Asp His Pro Pro Lys
 210 215

<210> 5
<211> 217
<212> PRT
<213> S.japonicum

<400> 5
Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro Thr
 1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu Tyr
 20 25 30

Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu Gly
 35 40 45

Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys Leu
 50 55 60

Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn Met
 65 70 75 80

Leu Gly Gly Ser Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu Gly
 85 90 95

Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser Lys
 100 105 110

Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu Met
 115 120 125

Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Ser His Lys Thr Tyr Leu Asn Gly
 130 135 140

Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp Val
 145 150 155 160

Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu Val
 165 170 175

Ser Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr Leu
 180 185 190

Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala Thr
 195 200 205

Phe Gly Gly Asp His Pro Pro Lys
 210 215

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 12 -

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> unknown

<220>
<223> Protease cleavage site

<400> 6
Glu Ala Leu Phe Gln Gly
1 5

<210> 7
<211> 43
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR primer

<400> 7
ccggaattcc aacgcgttcca tgaaccagaa gacaatcctc gtg

43

<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 8
cccccaagct tgtcgactca ctagttgtga gagagaagcc ccccc

45

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 9
gaggaaagg ttgttccaagg tggagatggg ggtgaa

36

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 10
gcattctagt tgtggtttgt c

21

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 13 -

<210> 11
<211> 37
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 11
gccggaaattc gacgcgtccc ctatactagg ttatgg

37

<210> 12
<211> 37
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 12
ctctgogcgc tcttttggag aaccacat gtttgtc

37

<210> 13
<211> 40
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 13
ggttctccaa aagagcgccg agagattca atgtttgaag

40

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 14
atgagataaa cggtottcga acattttcag catttc

36

<210> 15
<211> 44
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 15
gttcaagac cgtttatctc ataaaacata tttaaatgg gatc

44

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 14 -

<210> 16
<211> 33
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 16
aaaagaaaact agttttggga acgcatccag gca 33

<210> 17
<211> 40
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 17
ccccaaacta gtttcttta aaaaacgtat tgaagctatc 40

<210> 18
<211> 44
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> PCR Primer

<400> 18
acccaagott cctgactttg tgactttgga ggatggtcgc cacc 44

<210> 19
<211> 3000
<212> DNA
<213> unknown

<220>
<223> Recombinant construct

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(3000)

<400> 19
atg gat tgg ctg cgg aac ttg cta ttc ctg atg gcg gcc gct caa agt 48
Met Asp Trp Leu Arg Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15
atc aac gcc gcg caa cac gat gaa gcc gta gac aac aaa ttc aac aaa 96
Ile Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys
20 25 30

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

-15-

gaa caa caa aac gcg tcc cct ata cta ggt tat tgg aaa att aag ggc Glu Gln Gln Asn Ala Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly 35 40 45	144
ctt gtg caa ccc act cga ctt ctt ttg gaa tat ctt gaa gaa aaa tat Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr 50 55 60	192
gaa gag cat ttg tat gag cgc gat gaa ggt gat aaa tgg cga aac aaa Glu Glu His Leu Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys 65 70 75 80	240
aag ttt gaa ttg ggt ttg gag ttt ccc aat ctt cct tat tat att gat Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp 85 90 95	288
ggg gat gtt aaa tta aca cag tct atg gcc atc ata cgt tat ata gct Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala 100 105 110	336
gac aag cac aac atg ttg ggt ggt tct cca aaa gag cgc gca gag att Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Ser Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile 115 120 125	384
tca atg ctt gaa gga gcg gtt ttg gat att aga tac ggt gtt tcg aga Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg 130 135 140	432
att gca tat agt aaa gac ttt gaa act ctc aaa gtt gat ttt ctt agc Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser 145 150 155 160	480
aag cta cct gaa atg ctg aaa atg ttc gaa gac cgt tta tct cat aaa Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Ser His Lys 165 170 175	528
aca tat tta sat ggt gat cat gta acc cat cct gac ttc atg ttg tat Thr Tyr Leu Asn Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr 180 185 190	576
gac gct ctt gat gtt gtt tta tac atg gac cca atg tgc ctg gat ggc Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala 195 200 205	624
tcc cca aaa cta gtt tct ttt aaa aaa cgt att gaa gct atc cca caa Phe Pro Lys Leu Val Ser Phe Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln 210 215 220	672
att gat aag tac ttg aaa tcc agc aag tat ata gca tgg cct ttg cag Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln 225 230 235 240	720
ggc tgg caa gca acg ttt ggt ggt ggc gac cat cct cca aag tca caa Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Gln 245 250 255	768
agt cag gaa gct ttg ttc caa ggt gga gat ggg ggt gaa ccc agc cag Ser Gln Glu Ala Leu Phe Gln Gly Asp Gly Glu Pro Ser Gln 260 265 270	816

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 16 -

ctt ccc cat tgc ccc tct gta tct ccc agt gcc cag cct tgg aca cac Leu Pro His Cys Pro Ser Val Ser Pro Ser Ala Gln Pro Trp Thr His 275 280 285	864
cct ggc cag agc cag ctg ttt gca gac ctg agc cga gag gag ctg acg Pro Gly Gln Ser Gln Leu Phe Ala Asp Leu Ser Arg Glu Glu Leu Thr 290 295 300	912
gct gtg atg cgc ttt ctg acc cag cgg ctg ggg cca ggg ctg gtg gat Ala Val Met Arg Phe Leu Thr Gln Arg Leu Gly Pro Gly Leu Val Asp 305 310 315 320	960
gca gcc cag gcc cgg ccc tcg gac aac tgt gtc ttc tca gtg gag ttg Ala Ala Gln Ala Arg Pro Ser Asp Asn Cys Val Phe Ser Val Glu Leu 325 330 335	1008
cag ctg cct ccc aag gct gca gcc ctg gct cac ttg gac agg ggg agc Gln Leu Pro Pro Iys Ala Ala Leu Ala His Leu Asp Arg Gly Ser 340 345 350	1056
ccc cca cct gcc cgg gag gca ctg gcc atc gtc ttc ttt ggc agg caa Pro Pro Pro Ala Arg Glu Ala Leu Ala Ile Val Phe Phe Gly Arg Gln 355 360 365	1104
ccc cag ccc aac gtg agt gag ctg gtg ggg cca ctg cct cac ccc Pro Gln Pro Asn Val Ser Glu Leu Val Val Gly Pro Leu Pro His Pro 370 375 380	1152
tcc tac atg cgg gac gtg act gtg gag cgt cat gga ggc ccc ctg ccc Ser Tyr Met Arg Asp Val Thr Val Glu Arg His Gly Gly Pro Leu Pro 385 390 395 400	1200
tat cac cga cgc ccc gtg ctg ttc caa gag tac ctg gac ata gac cag Tyr His Arg Arg Pro Val Leu Phe Gln Glu Tyr Leu Asp Ile Asp Gln 405 410 415	1248
atg atc ttc aac aga gag ctg ccc cag gct tct ggg ctt ctc cac cac Met Ile Phe Asn Arg Glu Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Leu His His 420 425 430	1296
tgt tgc ttc tac aag cac cgg gga cgg aac ctg gtg aca atg acc acg Cys Cys Phe Tyr Lys His Arg Gly Arg Asn Leu Val Thr Met Thr Thr 435 440 445	1344
gct ccc cgt ggt ctg caa tca ggg gac cgg gcc acc tgg ttt ggc ctc Ala Pro Arg Gly Leu Gln Ser Gly Asp Arg Ala Thr Trp Phe Gly Leu 450 455 460	1392
tac tac aac atc tcc ggc gct egg ttc ttc ctg cac cac gtg ggc ttg Tyr Tyr Asn Ile Ser Gly Ala Gly Phe Leu His His Val Gly Leu 465 470 475 480	1440
gag ctg cta gtg aac cac aag gcc ctt gac cct gcc cgc tgg act atc Glu Leu Leu Val Asn His Iys Ala Leu Asp Pro Ala Arg Trp Thr Ile 485 490 495	1488
cag aag gtg ttc tat caa ggc cgc tac tac gac agc ctg gcc cag ctg Gln Lys Val Phe Tyr Gln Gly Arg Tyr Tyr Asp Ser Leu Ala Gln Leu 500 505 510	1536

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 17 -

gag gcc cag ttt gag gcc ggc ctg gtg aat gtg gtg ctg atc cca gac Glu Ala Gln Phe Glu Ala Gly Leu Val Asn Val Val Leu Ile Pro Asp 515 520 525	1584
aat ggc aca ggt ggg tcc tgg tcc ctg aag tcc cct gtg ccc ccg ggt Asn Gly Thr Gly Gly Ser Trp Ser Leu Lys Ser Pro Val Pro Pro Gly 530 535 540	1632
cca gct ccc cct cta cag ttc tat ccc caa ggc ccc cgc ttc agt gtc Pro Ala Pro Pro Leu Gln Phe Tyr Pro Gln Gly Pro Arg Phe Ser Val 545 550 555 560	1680
cag gga agt cga gtg gcc tcc tca ctg tgg act ttc tcc ttt ggc ctc Gln Gly Ser Arg Val Ala Ser Ser Leu Trp Thr Phe Ser Phe Gly Leu 565 570 575	1728
gga gca ttc agt ggc cca agg atc ttt gac gtt cgc ttc caa gga gaa Gly Ala Phe Ser Gly Pro Arg Ile Phe Asp Val Arg Phe Glu Gly Glu 580 585 590	1776
aga cta gtt tat gag ata agc ctc caa gag gcc ttg gcc atc tat ggt Arg Leu Val Tyr Glu Ile Ser Leu Gln Ala Leu Ala Ile Tyr Gly 595 600 605	1824
gga aat tcc cca gca gca atg acg acc cgc tat gtg gat gga ggc ttt Gly Asn Ser Pro Ala Ala Met Thr Arg Tyr Val Asp Gly Gly Phe 610 615 620	1872
ggc atg ggc aag tac acc acg ccc ctg acc cgt ggg gtg gad tgc ccc Gly Met Gly Lys Tyr Thr Pro Leu Thr Arg Gly Val Asp Cys Pro 625 630 635 640	1920
tac ttg gcc acc tac gtg gac tgg cac ttc ctt ttg gag tcc cac gag gcc Tyr Leu Ala Thr Tyr Val Asp Trp His Phe Leu Leu Glu Ser Gln Ala 645 650 655	1968
ccc aag aca ata cgt gat gcc ttt tgt gtt gaa cag aac cag ggc Pro Lys Thr Ile Arg Asp Ala Phe Cys Val Phe Glu Gln Asn Gln Gly 660 665 670	2016
ctc ccc ctg cgg cga cac cac tca gat ctc tac tcc cac tac ttt ggg Leu Pro Leu Arg Arg His Ser Asp Leu Tyr Ser His Tyr Phe Gly 675 680 685	2064
ggt ctt ggg gaa acg gtg gtc gtc aga tct atg tcc acc ttg ctc Gly Leu Ala Glu Thr Val Leu Val Arg Ser Met Ser Thr Leu Leu 690 695 700	2112
aac tat gac tat gtg tgg gat acg gtc ttc cac ccc agt ggg gcc ata Asn Tyr Asp Tyr Val Trp Asp Thr Val Phe His Pro Ser Gly Ala Ile 705 710 715 720	2160
gaa ata cga ttc tat gcc acg ggc tac atc agc tcc gca ttc ctc ttt Glu Ile Arg Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Ile Ser Ser Ala Phe Leu Phe 725 730 735	2208
ggc gct act ggg aag tac ggg aac caa gtc tca gag cac acc ctg ggc Gly Ala Thr Gly Lys Tyr Gly Asn Gln Val Ser Glu His Thr Leu Gly 740 745 750	2256

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 18 -

acg gtc cac acc cac agc gcc cac ttc aag gtg gat ctg gat gta gca Thr Val His Thr His Ser Ala His Phe Lys Val Asp Leu Asp Val Ala 755 760 765	2304
gga ctg gag aac tgg gtc tgg gcc gag gat atg gtc ttt gtc ccc atg Gly Leu Glu Asn Trp Val Trp Ala Glu Asp Met Val Phe Val Pro Met 770 775 780	2352
gct gtg ccc tgg agc cct gag cac cag ctg cag agg ctg cag gtg acc Ala Val Pro Trp Ser Pro Glu His Gln Leu Gln Arg Leu Gln Val Thr 785 790 795 800	2400
cgg aag ctg ctg gag atg gag gag cag gcc gcc ttc ctc gtg gga agc Arg Lys Leu Leu Met Glu Glu Gln Ala Ala Phe Leu Val Gly Ser 805 810 815	2448
gcc acc cct cgc tac ctg tac ctg gcc agc aac cac agc aac aag tgg Ala Thr Pro Arg Tyr Leu Tyr Leu Ala Ser Asn His Ser Asn Lys Trp 820 825 830	2496
ggg cac ccc cgg ggc tac cgc atc cag atg ctc agc ttt gct gga gag Gly His Pro Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Met Leu Ser Phe Ala Gly Glu 835 840 845	2544
ccg ctg ccc caa aac agc tcc atg gcg aga ggc ttc agc tgg gag agg Pro Leu Pro Gln Asn Ser Ser Met Ala Arg Gly Phe Ser Trp Glu Arg 850 855 860	2592
tac cag ctg gct gtg acc cag cgg aag gag gag gag ccc agt agc agc Tyr Gln Leu Ala Val Thr Gln Arg Lys Glu Glu Pro Ser Ser Ser 865 870 875 880	2640
agc gtt ttc aat cag aat gag cct tgg gcc ccc act gtg gat ttc agt Ser Val Phe Asn Gin Asn Asp Pro Trp Ala Pro Thr Val Asp Phe Ser 885 890 895	2688
gac ttc atc aac aat gag acc att gct gga aag gat ttg gtg gcc tgg Asp Phe Ile Asn Asn Glu Thr Ile Ala Gly Lys Asp Leu Val Ala Trp 900 905 910	2736
gtg aca gct ggt ttt ctg cat atc cca cat gca gag gac att cct aac Val Thr Ala Gly Phe Leu His Ile Pro His Ala Glu Asp Ile Pro Asn 915 920 925	2784
aca gtg act gtg ggg aac ggc gtg ggc ttc ttc ctc cga ccc tat aac Thr Val Thr Val Gly Asn Gly Val Gly Phe Phe Leu Arg Pro Tyr Asn 930 935 940	2832
ttc ttt gac gaa gac ccc tcc ttc tac tct gcc gac tcc atc tac ttc Phe Phe Asp Glu Asp Pro Ser Phe Tyr Ser Ala Asp Ser Ile Tyr Phe 945 950 955 960	2880
cga ggg gac cag gat gtc ggg gcc tgc gag gtc aac ccc cta gct tgc Arg Gly Asp Gln Asp Ala Gly Ala Cys Glu Val Asn Pro Leu Ala Cys 965 970 975	2928
ctg ccc cag gct gtc gtc gtc ccc gac ctc cct gcc ttc tcc cac Leu Pro Gln Ala Ala Cys Ala Pro Asp Leu Pro Ala Phe Ser His 980 985 990	2976

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 19 -

ggg ggc ttc tct cac aac tag tga
 Gly Gly Phe Ser His Asn
 995

3000

<210> 20
<211> 998
<212> PRT
<213> unknown

$\leq 400 \geq -20$

Met Asp Trp Leu Arg Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ile Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys
20 25 30

Glu Gln Gln Asn Ala Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly
35 40 45

Leu Val Gln Pro Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr
50 55 60

Lys Phe Glu Leu Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp
85 90 95

Gly Asp Val Lys Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala
100 105 110

Asp Lys His Asn Met Leu Gly Gly Ser Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile
115 120 125

Ser Met Leu Glu Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg

Ile Ala Tyr Ser Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser

Lys Leu Pro Glu Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Ser His Lys
165 170 175

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 20 -

Asp Ala Leu Asp Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala
 195 200 205

Phe Pro Lys Leu Val Ser Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln
 210 215 220

Ile Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln
 225 230 235 240

Gly Trp Gln Ala Thr Phe Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Gln
 245 250 255

Ser Gln Glu Ala Leu Phe Gln Gly Gly Asp Gly Gly Glu Pro Ser Gln
 260 265 270

Leu Pro His Cys Pro Ser Val Ser Pro Ser Ala Gln Pro Trp Thr His
 275 280 285

Pro Gly Gln Ser Gln Leu Phe Ala Asp Leu Ser Arg Glu Glu Leu Thr
 290 295 300

Ala Val Met Arg Phe Leu Thr Gln Arg Leu Gly Pro Gly Leu Val Asp
 305 310 315 320

Ala Ala Gln Ala Arg Pro Ser Asp Asn Cys Val Phe Ser Val Glu Leu
 325 330 335

Gln Leu Pro Pro Lys Ala Ala Leu Ala His Leu Asp Arg Gly Ser
 340 345 350

Pro Pro Pro Ala Arg Glu Ala Leu Ala Ile Val Phe Phe Gly Arg Gln
 355 360 365

Pro Gln Pro Asn Val Ser Glu Leu Val Val Gly Pro Leu Pro His Pro
 370 375 380

Ser Tyr Met Arg Asp Val Thr Val Glu Arg His Gly Gly Pro Leu Pro
 385 390 395 400

Tyr His Arg Arg Pro Val Leu Phe Gln Glu Tyr Leu Asp Ile Asp Gln
 405 410 415

Met Ile Phe Asn Arg Glu Leu Pro Gln Ala Ser Gly Leu Leu His His
 420 425 430

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 21 -

Cys Cys Phe Tyr Lys His Arg Gly Arg Asn Leu Val Thr Met Thr Thr
 435 440 445

Ala Pro Arg Gly Leu Gln Ser Gly Asp Arg Ala Thr Trp Phe Gly Leu
 450 455 460

Tyr Tyr Asn Ile Ser Gly Ala Gly Phe Leu His His Val Gly Leu
 465 470 475 480

Glu Leu Leu Val Asn His Lys Ala Leu Asp Pro Ala Arg Trp Thr Ile
 485 490 495

Gln Lys Val Phe Tyr Gln Gly Arg Tyr Tyr Asp Ser Leu Ala Gln Leu
 500 505 510

Glu Ala Gln Phe Glu Ala Gly Leu Val Asn Val Val Leu Ile Pro Asp
 515 520 525

Asn Gly Thr Gly Gly Ser Trp Ser Leu Lys Ser Pro Val Pro Pro Gly
 530 535 540

Pro Ala Pro Pro Leu Gln Phe Tyr Pro Gln Gly Pro Arg Phe Ser Val
 545 550 555 560

Gln Gly Ser Arg Val Ala Ser Ser Leu Trp Thr Phe Ser Phe Gly Leu
 565 570 575

Gly Ala Phe Ser Gly Pro Arg Ile Phe Asp Val Arg Phe Gln Gly Glu
 580 585 590

Arg Leu Val Tyr Glu Ile Ser Leu Gln Glu Ala Leu Ala Ile Tyr Gly
 595 600 605

Gly Asn Ser Pro Ala Ala Met Thr Thr Arg Tyr Val Asp Gly Gly Phe
 610 615 620

Gly Met Gly Lys Tyr Thr Thr Pro Leu Thr Arg Gly Val Asp Cys Pro
 625 630 635 640

Tyr Leu Ala Thr Tyr Val Asp Trp His Phe Leu Leu Glu Ser Gln Ala
 645 650 655

Pro Lys Thr Ile Arg Asp Ala Phe Cys Val Phe Glu Gln Asn Gln Gly
 660 665 670

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 22 -

Leu Pro Leu Arg Arg His His Ser Asp Leu Tyr Ser His Tyr Phe Gly
 675 680 685

Gly Leu Ala Glu Thr Val Leu Val Val Arg Ser Met Ser Thr Leu Leu
 690 695 700

Asn Tyr Asp Tyr Val Trp Asp Thr Val Phe His Pro Ser Gly Ala Ile
 705 710 715 720

Glu Ile Arg Phe Tyr Ala Thr Gly Tyr Ile Ser Ser Ala Phe Leu Phe
 725 730 735

Gly Ala Thr Gly Lys Tyr Gly Asn Gln Val Ser Glu His Thr Leu Gly
 740 745 750

Thr Val His Thr His Ser Ala His Phe Lys Val Asp Leu Asp Val Ala
 755 760 765

Gly Leu Glu Asn Trp Val Trp Ala Glu Asp Met Val Phe Val Pro Met
 770 775 780

Ala Val Pro Trp Ser Pro Glu His Gln Leu Gln Arg Leu Gln Val Thr
 785 790 795 800

Arg Lys Leu Leu Glu Met Glu Glu Gln Ala Ala Phe Leu Val Gly Ser
 805 810 815

Ala Thr Pro Arg Tyr Leu Tyr Leu Ala Ser Asn His Ser Asn Lys Trp
 820 825 830

Gly His Pro Arg Gly Tyr Arg Ile Gln Met Leu Ser Phe Ala Gly Glu
 835 840 845

Pro Leu Pro Gln Asn Ser Ser Met Ala Arg Gly Phe Ser Trp Glu Arg
 850 855 860

Tyr Gln Leu Ala Val Thr Gln Arg Lys Glu Glu Glu Pro Ser Ser Ser
 865 870 875 880

Ser Val Phe Asn Gln Asn Asp Pro Trp Ala Pro Thr Val Asp Phe Ser
 885 890 895

Asp Phe Ile Asn Asn Glu Thr Ile Ala Gly Lys Asp Leu Val Ala Trp
 900 905 910

WO 02/066669

PCT/SE02/00277

- 23 -

Val Thr Ala Gly Phe Leu His Ile Pro His Ala Glu Asp Ile Pro Asn
915 920 925

Thr Val Thr Val Gly Asn Gly Val Gly Phe Phe Leu Arg Pro Pro Tyr Asn
930 935 940

Phe Phe Asp Glu Asp Pro Ser Phe Tyr Ser Ala Asp Ser Ile Tyr Phe
945 950 955 960

Arg Gly Asp Gln Asp Ala Gly Ala Cys Glu Val Asn Pro Leu Ala Cys
965 970 975

Leu Pro Gln Ala Ala Ala Cys Ala Pro Asp Leu Pro Ala Phe Ser His
980 985 990

Gly Gly Phe Ser His Asn
995

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/00277
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C12P 21/02, C12N 15/12 // C 12 N 15/62 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: C12N, C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL WPI DATA, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9604382 A2 (CHIRON CORPORATION), 15 February 1996 (15.02.96), page 2, line 26 - page 3, line 10; page 13, line 16 - line 22 --	1-26
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 272, No 14, April 1997, Nicholas J. Morris et al, pages: 9388-9392, "Membrane Amine Oxidase Cloning and Identification as a Major Protein in the Adipocyte Plasma Membrane", page 9391, column 1, line 8 - line 45 & GenBank Acc.no: U39447 --	2,4-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2002	Date of mailing of the international search report 24-06-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Fax/faximile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Frida Plym Forsell/AE Telephone No. +46 8 782 25 00	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/00277
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Protein Science, VOLUME 6, 1997, Tatjana Tudyka et al, pages 2180-2187, "Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of Escherichia coli", page 2181, column 1, line 51 ~ line 54, abstract --	8-9,18
A	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, volume 83, November 1986, D.B. Smith et al, pages: 8703-8707, Mr 26,000 antigen of Schistosoma japonicum recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase", figure 2, & GenBank Acc.no: M14654 --	10
A	BIO/TECHNOLOGY, Volume 12, June 1994, Philip A. Walker, "Efficient and Rapid Affinity Purification of Proteins Using Recombinant Fusion Proteases", page 601 - page 605, abstract --	12-13,19-23
A	WO 9853049 A1 (BIOTIE THERAPIES LTD.), 26 November 1998 (26.11.98) see sequence no. 2, & GeneSeq Acc.no: AA403219 --	14
A	EP 0727211 A1 (SMITHKLINE BECHAM CORPORATION) 21 August 1996 (21.08.96) see sequences no. 8 and 9, & GeneSeq Acc. No: AAW02122 --	14
A	PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, Volume 11, 1997, Joakim Nilsson et al, pages 1-16, "Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification and Immobilization of Recombinant Proteins", page 9, column 1, line 49 ~ column 2, line 5 --	22-23

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/00277
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCOPES, R.K., Protein Purification, Principles and Practise, Third Edition. USA: Springer-Verlag, 1994 ISBN 0-387-94072-3, Chapter 9.1, pages 270-277, see pages 273-277 -- AEP 0412841 A1 (ELI LILLY AND COMPANY), 10 August 1990 (10.08.90), page 7, line 14 - line 21 -----	1-26

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			
		International application No. PCT/SE 02/00277	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604382 A2 15/02/96	AU CA EP US	3103195 A 2196097 A 0802979 A 6100064 A	04/03/96 15/02/96 29/10/97 08/08/00
EP 0412841 A1 10/08/90	AU CA HU HU IE IL JP	6085890 A 2022713 A 56876 A 904924 D 902907 A 95283 D 3133380 A	14/02/91 12/02/91 28/10/91 00/00/00 27/02/91 00/00/00 06/06/91

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NZ,PH,PL,P T,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ラッシュ・アブラー・セン

スウェーデン、エス - 168 58 プロマ、リレンクスガータン 28 番

(72)発明者 ヨアキム・ニルソン

スウェーデン、エス - 182 52 ダンデリド、メルビーダレン 5 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA08 CA01 CA07 FA17 FA18 GA11 HA11

4B050 CC05 DD11 EE10 LL01 LL03