

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 530873

(P2003 - 530873A)

(43)公表日 平成15年10月21日(2003.10.21)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 2 4
16/18		19/00	4 B 0 6 3
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15		1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 48数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 578487(P2001 - 578487)	(71)出願人	メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ ト ベシュレンクテル ハフトング MERCK PATENT GESEL LSCHAFT MIT BESCHR AENKTER HAFTUNG ドイツ連邦共和国 デー - 64293 ダルムシ ュタット フランクフルター シュトラ ー セ 250
(86)(22)出願日	平成13年4月11日(2001.4.11)	(72)発明者	ヴィルム、 クラウディア ドイツ連邦共和国 64291 ダルムシュタ ット ダーリエンヴェーク 24
(85)翻訳文提出日	平成14年10月18日(2002.10.18)	(74)代理人	弁理士 金田 暢之 (外 2 名)
(86)国際出願番号	PCT/EP01/04145		
(87)国際公開番号	W001/081400		
(87)国際公開日	平成13年11月1日(2001.11.1)		
(31)優先権主張番号	00108485.4		
(32)優先日	平成12年4月19日(2000.4.19)		
(33)優先権主張国	欧州特許庁(EP)		
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 N K - 2 ホメオボックス転写調節因子

(57)【要約】

N k × 2 - C 4 のポリペプチドおよびポリヌクレオチド、ならびにかかるポリペプチドを組換え技術によって製造するための方法が開示される。また、診断アッセイにおいて、該N k × 2 - C 4 のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを使用する方法も開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(a) 配列番号：1または配列番号：3の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

(b) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなるポリペプチド；

(c) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列、および

(e) (a)～(d)に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体からなる群のいずれか1つから選択されるポリペプチド。

【請求項2】 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 (a) 配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：1または配列番号：3の配列または少なくとも15塩基長を有するそのフラグメントを有する、標識されたプローブを用いて、厳格なハイブ

リダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、少なくとも100塩基長の塩基配列を有するポリヌクレオチド；

(f)(a)～(e)のポリヌクレオチドのRNA等価体であるポリヌクレオチド；

もしくは前記ポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド配列、および前記ポリヌクレオチドのポリヌクレオチドの変異体またはフラグメントであるか、あるいは前記のポリヌクレオチドに対して、その全長にわたって相補的であるポリヌクレオチド

からなる群のいずれか1つから選択されるポリヌクレオチド。

【請求項5】 (a)配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

(b)配列番号：1または配列番号：3の単離ポリヌクレオチド；

(c)配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド、および

(d)配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

からなる群から選択される、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 該発現ベクターが適合性宿主細胞に存在する際、請求項1に記載されるポリペプチドの生産が可能なポリヌクレオチドを含んでなる発現システム。

【請求項7】 請求項1に記載されるポリペプチドを発現している、請求項6に記載される発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項8】 請求項1に記載されるポリペプチドを製造するための方法であって、
請求項7に記載される宿主細胞を前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で培養して、該培養培地から該ポリペプチドを回収する工程を含んでなる方法。

【請求項9】 免疫グロブリンのFc領域と請求項1に記載の何れか一つのポリペプチドとからなる融合タンパク質。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか一項に記載されるポリペプチドに

対して免疫特異的な抗体。

【請求項11】 請求項1に記載されるポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞もしくは膜)あるいはその融合タンパク質に対する、候補化合物の結合を、該候補化合物に直接的または間接的に結合している標識によって、定量的または定性的に測定または検出すること；

(b) 標識された競合剤の存在下で、該ポリペプチド(または該ポリペプチドを発現している細胞あるいは膜)あるいはその融合タンパク質に対する、候補化合物の結合の競合を測定すること；

(c) 該ポリペプチドの活性化または阻害により発生するシグナルを、該候補化合物がもたらすか否かを、該ポリペプチドを発現している細胞または細胞膜に適合している検出システムを使用して試験すること；

(d) 候補化合物を、請求項1に記載されるポリペプチドを含有する溶液に混合して、混合物を作製し、該混合物中の該ポリペプチドの活性を測定し、そして、何らの候補化合物をも含有しないコントロールの混合物に対して、該混合物の活性を比較すること、または

(e) 細胞中における前記ポリペプチドをコードするmRNAまたは前記ポリペプチドの産生に対する候補化合物の作用を、例えば、ELISAアッセイを使用して検出すること、

からなる群から選択される方法と、

(f) 生物工学的または化学的な標準的な手法に従って、前記化合物を製造すること

とを含んでなる方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、以降、時に、「新規NK-2ホメオボックス転写調節因子(Nkx2-C4)」と称する、新たに同定されたポリペプチド、およびかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、診断ならびに、治療において潜在的に有用なアゴニスト、アンタゴニストとなり得る化合物の同定におけるそれらの使用、ならびに、かかるポリヌクレオチドの製造に関する。

【0002】**(発明の背景)**

医薬探索プロセスは、現在、「機能的ゲノミクス」、すなわち、ハイ・スループットな、ゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を取り込むことで、根本的な革新を経験しつつある。治療の標的として、遺伝子および遺伝子産物を同定する手段として、この方法は、急速に、「ポジショナル・クローニング」に基づく従前の方法に取って代わりつつある。表現型、すなわち、生物学的機能または遺伝子的疾患を同定し、その後、その遺伝子地図の位置に基づいて、その原因となる遺伝子の探知がなされる。

【0003】

機能的ゲノミクスは、ハイ・スループットなDNA配列決定技術、および現に利用可能な多くの分子生物学データベースから、潜在的な重要性を有する遺伝子配列を同定するためのバイオ・インフォマティクスの様々なツールに、大きく頼っている。医薬探索の標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/タンパク質を同定し、その特定を行うことが引き続き求められている。

【0004】**(発明の概要)**

本発明は、Nkx2-C4、特に、Nkx2-C4ポリペプチドおよびNkx2-C4ポリヌクレオチド、組換え体およびその製造方法に関する。かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、それらに限定はされないものの、異なった病因の急性及び慢性の心不全、心筋梗塞、心臓肥大、不整脈、心筋症、肺高血

圧、心毒症（例えば化学療法により誘発）および冠状動脈性心疾患を含む、特定の疾患（以降「本発明の疾患」と称する）を治療する方法に関連して、注目されている。さらなる形態において、本発明は、本発明により提供される材料を使用して、アゴニスト及びアンタゴニスト（例えば阻害剤）を同定するための方法、ならびにその同定された化合物を用いて、 $Nk \times 2 - C4$ の不均衡に関連する症状を治療するための方法に関する。さらに他の形態において、本発明は、不適当な $Nk \times 2 - C4$ の活性および濃度に付随する疾患を検出するための診断アッセイにも関する。

【0005】

（発明の説明）

第1の形態において、本発明は $Nk \times 2 - C4$ ポリペプチドに関する。かかるポリペプチドには、

（a）配列番号：1または配列番号：3の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

（b）配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなるポリペプチド；

（c）配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列を含んでなるポリペプチド；

（d）配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド；

（e）配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列；ならびに

（f）配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列を有するか、または含んでなるポリペプチド；

（g）（a）～（f）に記載のかかるポリペプチドのフラグメントおよび変異体が含まれる。

【0006】

本発明のポリペプチドは、NK-2ホメオボックス転写調節因子ファミリーのポリペプチドの一員であると考えられる。従って、それらは、NK-2ホメオボックス転写調節因子ファミリーの一員としてNkx2-C4を阻害することは心臓肥大を予防するための薬理学的アプローチとなるかもしれないという点で注目されている。心筋細胞は発生のすぐ後に激増させる細胞周期を退去し、続く細胞分割の能力をほとんどまたは全く持たない。それゆえに、成熟した心筋は非心筋梗塞の順応できる肥大性反応による梗塞の結果、増加した血圧及び別の心室ストレスに反応する。しかしながら、血行動態ストレスの慢性化の間、心筋は最終的には取り返しのつかない機能の低下、続いて心筋衰弱をもたらす。従って、心筋肥大をもたらすシグナル経路の特定は心筋衰弱の分子基盤での最終的な解明となることは決定的である。このことは心筋肥大及び心疾患の予防のための新規薬理学的アプローチを導くであろう。

【0007】

ホメオボックス含有遺伝子は組織分化に必須の組織特異的遺伝子の発現を規定すること、さらに同様に時空間的な発現パターンを定義することにおいて重大な役割を示す(Shiojima, et al. (1995) Genomics 27(1): 204-206)。ショウジョウバエにおいては、チンマン(tinman)・ホメオボックス遺伝子は絶対的に心臓発現が要求される。脊椎動物においては、心臓のNK-2遺伝子であるチンマン関連遺伝子の小さなファミリーは脊椎動物の心臓の形成に同様の役割を示すように思われる(Evans (1999) Semin. Cell Dev. Biol. 10(1): 73-83)。それぞれの種は“チンマン様”機能を実行するためにチンマン・ホモログのはっきりとしたレパートリーを発達させる。いくつかのホモログはたった一種にのみ表れる。

【0008】

本明細書に記載のNkx2-C4は第4染色体に位置している。Nkx2-C4はNK-2クラスホメオドメインを保持し、同様に保存TN、NK-2特異、リンカー及びGVRAWドメインを保持する。脊椎動物の公知のNK-2ホメオ

ボックス遺伝子 (Evans (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* 10 (1): 73 - 83) の中で、ヒト Nkx2 - C4 はマウス Nkx2 - 6 に対して高い相同性を示す。マウス Nkx2 - 6 は咽頭嚢下部、心臓下部、静脈洞、及び心臓の流出区域あるいは胚形成初期段階の腸の断片に発現する (Biben, et al. (1998) *Mech. Dev.* 73 (1): 125 - 127)。現在最も知られているのは Nkx2 - 5 の役割である。Nkx2 - 5 は心臓にのみ発現し、発現は発達の間続き、さらに成人の段階においても発現する (Komuro and Izumo (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (17): 8145 - 8149)。最近になって、この遺伝子の異型結合の突然変異が見つかり、これはヒトの先天性心疾患の原因となっていることが分かった (Schott, et al. (1998) *Science* 281 (5373): 108 - 111)。心臓の形態形成の間の分割の規定、及び寿命の間の房室結節機能の成熟及び維持において、Nkx2 - 5 は重要である (Pease, et al. (1976) *Circulation* 53 (5): 759 - 762、Basson, et al. (1995) *Circulation* 91 (5): 1326 - 1329、Pauli, et al. (1999) *Am J Med Genet.* 85 (4): 419 - 423)。最近のデータでは、Nkx2 - 5 は成人の心臓肥大誘発に係わっているかも知れないことが示唆された。右心室肥大のネコ科肺動脈絞扼モデルにおいて初期刺激として圧力の過負荷をすることにより Nkx2 - 5 の mRNA レベルは最大の心筋成長の間、数倍のレベルで増加する。心房性ナトリウム利尿因子およびアルファ - 心アクチンは Nkx2 - 5 DNA 結合要素によって部分的に活性化され、さらに増加する (Thompson, et al. (1998) *Am J Physiol* 274 (5 Pt 2): H1569 - H1573)。アドレナリン受容体アゴニストはイン・ビボ及びイン・ビトロにおいて、肥大性表現型を誘発する。イソプロテレノールまたはフェニレフリンを成熟した雄のマウスに注入すると、心臓肥大を誘発し、さらに ANF、ベータ - MHC、GATA - 4、Nkx2 - 5、Egr - 1、c - jin および c - fos 発現が増加する (Saadane, et al. (1999) *Br. J Pharmacol* 127 (5

) : 1165 - 1176)。心臓病制限 (cardiac-restricted) アンキリン複写タンパク質 (cardiac-regulator ankyrin repeat protein) (CARP) 遺伝子は心遺伝子の発現のために細胞核相互規制をコードし、それは心臓ホメオボックス遺伝子 $Nkx2-5$ の流れにある。CARP 遺伝子の発現は、心臓肥大の間に飛躍的にもたらされる (Kuo, et al. (1999) Development 126 (19) : 4223 - 4234)。

【0009】

該 $Nkx2-C4$ の生物学的性質を、以降、「 $Nkx2-C4$ の生物学的活性」、または「 $Nkx2-C4$ 活性」と称する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの $Nkx2-C4$ の生物学的活性を示す。

【0010】

本発明のポリペプチドには、全ての対立遺伝子形およびスプライス変異体を含む、上記ポリペプチドの変異体もまた含まれる。かかるポリペプチドは、挿入、欠失、ならびに保存的または非保存的であってもよい置換、あるいはそれらの任意の組合せによって、基準のポリペプチドから変異している。特に好ましい変異体は、幾つかの、例えば、50～30、30～20、20～10、10～5、5～3、3～2、2～1、または1個のアミノ酸が、任意の組合せで、挿入、置換または欠失されているものである。

【0011】

本発明のポリペプチドの好ましいフラグメントには、配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列に由来する、少なくとも30、50または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド、あるいは配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列から、少なくとも30、50または100の連続したアミノ酸が末端から除去または欠失しているアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、 $Nkx2-C4$ の生物学的活性をもたらす、生物学的に活性なフラグメントであり、類似する活性または改善された活性を有するか、あるいは望ましくない活性の低下したものも含まれる。また、動物、特に、ヒトにおいて抗原性または免疫原性である、それ

らのフラグメントも好ましい。

【0012】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、対応する完全長型ポリペプチドをペプチド合成によって製造するために用いることができ；従って、これらの変異体は、本発明の完全長型ポリペプチドを製造するための中間体として用いることができる。本発明のポリペプチドは、「成熟型」タンパク質の形態であってもよく、あるいは、前駆体または融合タンパク質などの、より大きなタンパク質の一部であってもよい。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製に役立つ配列、例えば、反復するヒスチジン残基、あるいは組換え生産の間の安定性に利する付加配列が含まれる、付加的なアミノ酸配列を含むことは、しばしば、有益である。

【0013】

本発明のポリペプチドは、何れかの好適な方法、例えば、天然に存在する提供源や、発現システム（下記参照）を含んでなる遺伝子操作された宿主細胞からの単離、または、例えば、自動化されたペプチド合成機を使用した化学合成によって、あるいは、かかる方法の組合せによって、調製することができる。かかるポリペプチドを調製するための手段は、当該分野では十分に理解されている。

【0014】

さらなる形態において、本発明は、 $N_k \times 2 - C_4$ ポリヌクレオチドに関する。かかるポリヌクレオチドには、

（a）配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

（b）配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチド；

（c）配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド；

（d）配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド；

（e）配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なく

とも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(f) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド；

(g) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；

(j) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなるポリヌクレオチド；ならびに

上記のポリヌクレオチドのフラグメントおよび変異体である、またはその全長にわたって、上記のポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチドが含まれる。

【0015】

本発明のポリヌクレオチドの好ましいフラグメントには、配列番号：1または配列番号：3の配列に由来する、少なくとも15、30、50または100の連続した塩基を有する塩基配列を含んでなるポリヌクレオチド、あるいは配列番号：1または配列番号：3の配列から、少なくとも30、50または100個の連続した塩基が末端から削除または欠失している配列を含んでなるポリヌクレオチドが含まれる。

【0016】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体には、スプライス変異体、対立遺伝子変異体、および1つまたは複数の単一塩基多型(SNP)を有するポリヌク

レオチドを含む多型体が含まれる。

【0017】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2または配列番号：4のアミノ酸配列を含んでなり、かつ幾つかの、例えば、50～30、30～20、20～10、10～5、5～3、3～2、2～1、または1個のアミノ酸残基が、任意の組合せで置換、欠失または付加されているポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドもまた含まれる。

【0018】

さらなる形態において、本発明は、本発明のDNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。従って、

(a) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含んでなる；

(b) 配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物である；

(c) 配列番号：1または配列番号：3のDNA配列のRNA転写物を含んでなる；あるいは

(d) 配列番号：1または配列番号：3のDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；

ならびにそれらに対して相補的であるRNAポリヌクレオチドが提供される。

【0019】

配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列は、マウスnkx2-6 (AF045150; Biben, C. および Hatzistavrou, T., direct submission GeneBank, 1998) との相同性を示す。配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列は、配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号：1または配列番号：3の配列をコードするポリペプチドと同一であってもよく、あるいは遺伝子暗号の縮退（縮重性）の結果によって、

同じく配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドをコードする、配列番号：1または配列番号：3以外の配列であってもよい。配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドは、マウス *nkx2-6* (Biben, et al. (1998) *Mech. Dev.* 73(1):125-127) との相同性および/または構造的類似性を有する、NK-2ホメオボックス転写調節因子ファミリーの他のタンパク質と類縁している。

【0020】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、それらの相同的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似する生物学的な機能/性質を有することが期待される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、少なくとも1つの *Nkx2-C4* 活性を有する。

【0021】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒトの胎児心臓の細胞中のmRNAに由来するcDNAライブラリーから標準的なクローニング技術およびスクリーニング技術を使用して取得することができる(例えば、Sambrook 他、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (1989) 参照)。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリーなどの天然の供給源から取得することもでき、あるいは、周知の、市販の手法を使用して合成することもできる。

【0022】

本発明のポリヌクレオチドを、本発明のポリペプチドの組換え製造に使用する際には、該ポリヌクレオチドは、成熟型ポリペプチドのコード配列、それ自体、あるいはリーダーまたは分泌配列、プレ-、もしくはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列、あるいは、他の融合ペプチド部分をコードするコード配列などの、他のコード配列と読み枠を合わせた成熟型ポリペプチドのコード配列を含むことができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にする、マーカー配列がコードされていてもよい。本発明のこの形態の幾つかの好ましい実施態様において

、該マーカ配列は、pQEベクター（Qiagen, Inc.）中に提供され、そしてGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989) 86: 821~824に記載されている、ヘキサ・ヒスチジン・ペプチド、あるいはHAタグである。該ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳の配列、スプライシングならびにポリアデニレーション・シグナル、リボソーム結合部位、ならびにmRNAを安定化させる配列などの、非コードの5'ならびに3'配列を含んでもよい。

【0023】

配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチド配列に対して、同一であるか、または十分な同一性を有するポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーション・プローブとして、あるいは核酸増幅反応（例えば、PCR）用のプライマーとして、利用することができる。かかるプローブおよびプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする完全長型cDNAおよびゲノム・クローンを単離するために、ならびに、配列番号：1または配列番号：3に対して、高い配列類似性、典型的には、少なくとも95%の同一性を有する他の遺伝子（ヒトの供給源に由来するパラログ、ならびにヒト以外の種に由来するオルソログおよびパラログをコードする遺伝子を含む）のcDNAおよびゲノム・クローンを単離するために使用してもよい。好ましいプローブおよびプライマーは、一般に、少なくとも15塩基、好ましくは少なくとも30塩基を含み、そして少なくとも100塩基ではなくとも、少なくとも50塩基を有してもよい。特に好ましいプローブは、30~50塩基を有するであろう。特に好ましいプライマーは、20~25塩基を有するであろう。

【0024】

ヒト以外の種に由来するホモログをも含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1または配列番号：3の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングする過程；および前記ポリヌクレオチド配列を含有する完全長型cDNAクローンおよびゲノム・クローンを単離する過程を含んでなる工程によって取得しても

よい。かかるハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知である。好ましい厳格なハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性させた剪断サケ精子DNAを含んでなる溶液中で、42℃、一晩インキュベーションし、その後、0.1×SSC中で、約65℃にてフィルターを洗浄することが含まれる。従って、本発明にはまた、配列番号：1または配列番号：3の配列、またはそのフラグメントを有する、好ましくは少なくとも15塩基の標識されたプローブを用いて、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリーをスクリーニングすることによって取得される、単離されたポリヌクレオチド、好ましくは少なくとも100塩基の塩基配列を有する単離されたポリヌクレオチドも含まれる。

【0025】

当業者は、多くの場合において、該ポリペプチドをコードする領域は、5'末端に至るまで完全には伸長していない点で、単離されたcDNA配列は不完全であることもあることを理解している。これは、第1鎖のcDNA合成の際に、mRNAテンプレートのDNAコピーを完成させることができない、逆転写酵素、すなわち、本来、低い「プロセシング能」(ポリメリゼーション反応の間、テンプレートに結合した状態を維持する酵素の能力の指標)を有する酵素の結果である。

【0026】

完全長型cDNAを取得する、あるいは短いcDNAを伸長させるために利用でき、かつ当業者に周知の方法がいくつかあり、例えば、cDNA端の迅速な増幅(RACE)方法に基づく方法がある(例えば、Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998~9002, 1988参照)。例えば、Marathon(商標)法(Clontech Laboratories Inc.)で例示される、この技術の最近の改良は、より長いcDNAの探索を著しく簡単としている。Marathon(商標)法では、選択された組織から抽出されたmRNAと、その両端に連結された「

アダプター」配列とから、cDNAが調製される。その後、遺伝子特異的なならびにアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを使用して、cDNAの「失われている」5'端を増幅するために、核酸増幅(PCR)を実施する。その後、「ネスティッド(入れこ型)」プライマー、すなわち、増幅産物の内部にアニーリングするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列においてさらに3'側にアニーリングするアダプター特異的なプライマー、および既知の遺伝子配列においてさらに5'側にアニーリングする遺伝子特異的なプライマー)を使用して、PCR反応を繰り返す。そして、この反応の生成物をDNA配列決定によって分析することができ、また、完全な配列を与えるように、既存のcDNAに該生成物を直接結合させる、あるいは、5'プライマーの設計のために新しい配列情報を利用して、別途に完全長のPCRを実施することのいずれかによって、完全長型のcDNAを構築することができる。

【0027】

本発明の組換えポリペプチドは、発現システムを含んでなる遺伝子操作された宿主細胞から、当該分野で周知の製法によって調製することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドの1つまたは複数を含んでなる発現システム、かかる発現システムで遺伝子操作されている宿主細胞、ならびに、組換え技術による本発明のポリペプチドの製造に関する。無細胞翻訳システムもまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用して、かかるタンパク質を製造するために使用することができる。

【0028】

組換え製造のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドに対する発現システムまたはその一部を取り込むように、遺伝子操作することができる。ポリヌクレオチドは、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrook et al. (前述) などの、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている方法によって宿主細胞中に導入することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入する好ましい方法には、例えば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクショ

ン、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、スクレイプ負荷、バリスティック導入または感染が含まれる。

【0029】

適当な宿主の代表的な例には、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、大腸菌、ストレプトミセス属ならびに枯草菌細胞などの細菌細胞；酵母細胞やアスペルギルス属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2細胞や *Spodoptera Sf9* 細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293ならびにBowesメラノーマ細胞などの動物細胞；および植物細胞が含まれる。

【0030】

非常に多様な発現システムを使用することができ、例えば、染色体、エピソームおよびウイルスに由来するシステム、例えば、細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、バキュロウイルス、パポバウイルス (SV40など)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスやレトロウイルスなどのウイルスに由来するベクター、ならびに、コスミドやファージミドなどの、プラスミドおよびバクテリオファージの遺伝子エレメントから誘導されたものなどの、それらの組合せに由来するベクターを使用することができる。該発現システムは、発現を生じさせるとともに、調節をする制御領域を含有してもよい。一般に、宿主内において、ポリペプチドを生産するためのポリヌクレオチドを維持、増殖、または発現させることが可能である、システムまたはベクターはいずれも使用することができる。適切なポリヌクレオチド配列は、例えば、Sambrook et al. (前述) 中に示されているものなどの、周知で慣用の手法種々のいずれかによって発現システムに挿入することができる。適当な分泌シグナルを、小胞体の内腔、ペリプラズム腔または細胞外環境への翻訳タンパク質の分泌を可能にするために、所望するポリヌクレオチドに組み込むことができる。これらのシグナルは、該ポリペプチドに対して内因性であってもよく、あるいは異種のシグナルであってもよい。

【0031】

スクリーニング・アッセイにおいて使用するために、本発明のポリペプチドを発現させる際には、該ポリペプチドは細胞の表面で産生されることが、一般に好ましい。この場合、スクリーニング・アッセイにおいて使用するに先立ち、細胞を集菌してもよい。該ポリペプチドが培地内に分泌される場合には、該ポリペプチドの回収および精製を行うため、培地を回収することができる。細胞内で産生される場合には、ポリペプチドを回収する前に、細胞を予め溶解しなければならない。

【0032】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティー・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィおよびレクチン・クロマトグラフィを含む、周知の方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、ハイ・パフォーマンス・液体クロマトグラフィが精製のために使用される。該ポリペプチドが、細胞内合成、単離および/または精製の間に変性する際には、周知のタンパク質のリフォールディング方法を、活性な立体配座を再生させるために使用することができる。

【0033】

本発明のポリヌクレオチドは、関連する遺伝子における変異の検出を通して診断試薬として使用することができる。cDNA配列またはゲノム配列において、配列番号：1または配列番号：3のポリヌクレオチドによって特定され、また、機能不全に関連している、変異体型遺伝子の検出は、その遺伝子の過少な発現、過剰発現、あるいは変更された空間的または時間的な発現に起因する、疾患または疾患に対する感受性の診断に付加、あるいは、確定させることができる診断ツールを提供する。遺伝子に変異を有する個体は、当該分野で周知な様々な手法によって、DNAレベルで検出することができる。

【0034】

診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または

剖検試料などから得ることできる。ゲノムDNAを、直接、検出のために使用してもよく、あるいは、分析に先立ち、PCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅技術を使用して、酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAもまた、同様な手順で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズにおける変化によって検出することができる。点変異は、増幅されたDNAを、標識されたNkx2-C4塩基配列に対して、ハイブリダイゼーションさせることによって同定することができる。完全に一致する配列は、ミスマッチした二重鎖と、RNase消化、あるいは融解温度における差によって、弁別することができる。DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下での、ゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって、あるいは、直接的なDNA配列決定によって検出してもよい（例えばMyers et al., Science, (1985) 230:1242参照）。特定の位置における配列の変化もまた、RNaseならびにS1保護などの、ヌクレアーゼ保護アッセイ、あるいは化学的な切断方法によって、明らかにすることもできる（Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 85:4397~4401参照）。

【0035】

Nkx2-C4のポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含んでなるオリゴヌクレオチド・プローブのアレイを、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。かかるアレイは、好ましくは、高密度のアレイまたは格子状である。アレイ化技術の方法は、周知であり、一般的な適用性を有しており、また、遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変動性を含む、分子遺伝学における様々な問題を解明するために使用することができ、例えば、M. Chee et al., Science, 274, 610~613 (1996) およびそれに引用されている他の参考文献を参照する。

【0036】

異常に、低下または増大しているポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの検出もまた、本発明の疾患に対する、被験体の感受性を診断または検出するために使用することができる。低下、または増大した発現は、例えば、核酸増幅、例

例えば、PCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザン・ブロットおよび他のハイブリダイゼーション法などの、当該分野で周知の、ポリヌクレオチドの定量方法のいずれかを使用して、RNAレベルで測定することができる。宿主に由来するサンプルにおける、本発明のポリペプチドなどのタンパク質レベルを決定するために使用することができるアッセイ手法は、当業者には周知である。かかるアッセイ方法には、放射免疫アッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタン・ブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0037】

したがって、別の形態において、本発明は、

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号：1または配列番号：3のヌクレオチド配列またはそのフラグメントもしくはそのRNA転写物；

(b) (a)の配列に対して相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは、配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドまたはそのフラグメント；あるいは

(d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号：2または配列番号：4のポリペプチドに対する抗体を含んでなる診断キットに関する。

【0038】

かかるキットの何れにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な成分を構成することできることは理解される。かかるキットは、疾患または疾患に対する感受性、中でも、特に本発明の疾患を診断する際に有用である。

【0039】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体局在化の研究に有益である。該配列は、個々のヒト染色体上の特定位置に対して、特異的に標的化されており、そして、ハイブリダイゼーションすることができる。本発明に従って、関連する配列を染色体にマッピングすることは、それらの配列を遺伝子関連疾患と関連させる上での、重要な最初の過程である。一度、配列を正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上における該配列の物理的な位置を、遺伝地図データと関連させることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusick、ヒトにお

けるメンデル遺伝 (Johns Hopkins 大学 Welch Medical Library を通してオンラインで利用可能である) 中に見出される。同じ染色体領域にマッピングされている、遺伝子と疾患と間の関係は、その後、連鎖解析 (物理的に隣り合う遺伝子の同時遺伝) を通して、同定される。ゲノム配列 (遺伝子フラグメントなど) に関する、正確なヒト染色体上の局在化は、放射ハイブリッド (RH) マッピングを使用して決定することができる (Walter, M., Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J. および Goodfellow, P. (1994)、ゲノム全体の放射ハイブリッド・マップを構築するための方法、Nature Genetics、7、22~28)。多数の RH パネルを、Research Genetics (Huntsville, AL、米国) から、例えば、GeneBridge 4 RH パネル (Hum. Mol. Genet., 1996, Mar; 5 (3): 339~46、ヒトゲノムの放射ハイブリッド・マップ。Gyapay G., Schmitt K., Fizames C., Jones H., Vega-Czarny N., Spillet D., Muselet D., Prud'Homme J.F., Dib C., Auffray C., Morissette J., Weissenbach, J. および Goodfellow, P. N.) を入手可能である。このパネルを使用して遺伝子の染色体上の位置を決定するためには、RH DNA 上の関心のある遺伝子から設計されたプライマーを使用して、93 回の PCR が行われる。これらの DNA のそれぞれは、ハムスターのバックグラウンド (ヒト/ハムスターのハイブリッド細胞株) 中に維持された、ランダムなヒト・ゲノム・フラグメントを含んでいる。このような PCR は、目的とする遺伝子の PCR 産物の存在または非存在を示す、93 のスコアをもたらす。これらのスコアは、既知の位置のゲノム配列に由来する PCR 産物を使用して作製されたスコアと比較される。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu/> において行われる。本発明の遺伝子はヒト染色体の第 4 染色体にマッピングされる。

【0040】

本発明のポリヌクレオチド配列はまた、組織発現の研究に対する有益なツール

である。かかる研究は、それらをコードするmRNAを検出することによって、コードされたポリペプチドの組織内の発現パターンに関する指標を与える、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの決定を可能とする。使用される技術は、当該分野では周知であり、また、cDNAマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(Schene et al., Science, 270, 467~470、1995およびShalon et al., Genome Res., 6, 639~645、1996)などの、格子上に配列されたクローンに対する系内・ハイブリダイゼーション技術、ならびにPCRなどの塩基増幅技術を含む。好ましい方法は、Perkin Elmerから入手可能なTAQMAN(商標)法を使用する。これらの研究による結果は、生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を提供する。加えて、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の形態(例えば、潜在的または調節的な変異をコードするポリペプチドにおける変化を有するもの)によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、本発明のポリペプチドの役割、または疾患におけるその不適切な発現の役割に対する有益な見識を提供することができる。かかる不適切な発現は、時間的、空間的または単に量的な性質のものであってもよい。

【0041】

本発明のポリペプチドは、胎児心臓において発現される。

【0042】

本発明のさらなる形態は、抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはそのフラグメント、あるいはそれらを発現している細胞は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的である抗体を作製するための免疫原として、使用することができる。「免疫特異的」の用語は、抗体が、先行技術における他の関連するポリペプチドに対するそれらの親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して、実質的により大きな親和性を有することを意味する。

【0043】

本発明のポリペプチドに対して生成される抗体は、慣用的なプロトコルを使用して、該ポリペプチドまたはエピトープ保持したフラグメント、あるいは細胞を、動物、好ましくは、非ヒト動物に、投与することによって取得することができ

る。モノクローナル抗体の調製には、継代的な細胞株培養物によって産生される抗体を提供する技術のいずれをも、使用することができる。例には、ハイブリドーマ技術(Kohler, G. および Milstein, C., Nature (1975)、256:495~497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today (1983)、4:73)、およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、77~96、Alan R. Liss, Inc., 1985)が含まれる。

【0044】

米国特許第4,946,778号に記載されているものなどの、一本鎖抗体を製造するための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を製造する上で応用することができる。また、トランスジェニック・マウス、あるいは、他の哺乳動物を含む他の生物を、ヒト化抗体を発現させるために使用してもよい。

【0045】

上記抗体は、該ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定するために、あるいはアフィニティー・クロマトグラフィによって該ポリペプチドを精製するために使用してもよい。本発明のポリペプチドに対する抗体は、また、中でも、本発明の疾患を治療するために使用することができる。

【0046】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまた、ワクチンとして使用することができる。従って、さらなる形態において、本発明は、その疾患が個体において既に慢性化しているか否かに関わらず、前記動物を疾患から保護するために、抗体および/またはT細胞免疫応答(例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む)を生じさせるに適する、本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含んでなる、哺乳動物における免疫学的応答を誘導するための方法に関する。哺乳動物における免疫学的応答はまた、本発明にかかる疾患から前記動物を保護するための抗体を産生するような、かかる免疫学的応答を

誘導するために、*in vivo*で、該ポリヌクレオチドの発現を支配し、かつ該ポリペプチドをコードしているベクターによって、本発明のポリペプチドを送達することを含んでなる方法によって誘導してもよい。該ベクターを投与する1つの方法は、粒子またはそれ以外のものの上へのコーティング物として、所望する細胞中へのそれを促進することによる。かかる核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾型核酸またはDNA/RNAハイブリッドを含むことができる。用途によって、ワクチン、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン配合物（組成物）として提供される。該配合物はさらに、適合するキャリアを含むことができる。ポリペプチドは胃において分解されることもあるため、それは、好ましくは非経口的に投与される（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、あるいは皮内注射）。非経口投与に好適な配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、ならびに配合物を接種者の血液と等張性にする溶質を含んでもよい、水性および非水性の無菌注射液；ならびに懸濁剤または増粘剤を含んでもよい、水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。該配合物は、単位用量または多回用量容器、例えば、密封されたアンプルならびにバイアルに入れて提供することができ、また、使用直前に無菌の液体キャリアを添加するだけでよい、凍結乾燥状態で保存することができる。該ワクチン配合物はまた、水中油型システムや当該分野で既知のその他のシステムなどの、配合物の免疫原性を増強するためのアジュバント・システムを含むことができる。投与量は、該ワクチンの比活性に依存し、型どおりの実験によって容易に決定することができる。

【0047】

本発明のポリペプチドは、1つまたはそれ以上の疾患状態、特に、既に記載した本発明の疾患に関連している、1つまたはそれ以上の生物学的機能を有する。従って、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定することは有用である。従って、さらなる形態において、本発明は、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激または阻害する化合物を同定するために、化合物をスクリーニングする方法を提供する。かかる方法は、上記のような本発明にの疾患に対する治療および予防目的のために使用することができる、アゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は、様々な供給源、例えば、細胞、無細胞調

製物、化学的ライブラリー、化学化合物のコレクション、および天然産物混合物から同定することができる。このように同定される、かかるアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によっては、ポリペプチド自体の、天然または修飾された基質、リガンド、受容体、酵素など；その構造的または機能的な模倣体（Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1(2):5章(1991)参照）あるいは小分子であってもよい。

【0048】

該スクリーニング方法は、候補化合物に直接的または間接的に連結されている標識を利用して、該ポリペプチド、あるいは該ポリペプチドまたはその融合タンパク質を表出している細胞または膜に対する候補化合物の結合を単に測定することでもよい。代わりに、該スクリーニング方法は、標識された競合剤（例えばアゴニストまたはアンタゴニスト）に対して、候補化合物のポリペプチドに対する競合的な結合の（定性的または定量的に）測定または検出を含んでもよい。さらに、これらのスクリーニング方法では、該ポリペプチドを表出している細胞に適する検出システムを使用して、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって誘起されるシグナルをもたらすか否かを調べることもよい。活性化の阻害剤は、一般には既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして、候補化合物の存在による、アゴニストによる活性化に対する作用を観測する。さらに、該スクリーニング方法は、候補化合物を、本発明のポリペプチドを含有する溶液と混合して、混合体を形成させる工程、混合物における $Nk \times 2 - C4$ 活性を測定する工程、および混合物の $Nk \times 2 - C4$ を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較する工程を単に含んでもよい。

【0049】

本発明のポリペプチドは、従来の低い容量のスクリーニング方法、そして、また、ハイ・スループットなスクリーニング（HTS）形態においても、使用することができる。かかるHTS形態には、十分に確立された、96-、また、最近では、384-ウエル・マイクロ・タイター・プレートの使用のみでなく、Schullek et al., Anal. Biochem., 246, 20~2

9 (1 9 9 7) に記載されている、ナノウエル法などの開発途上の方法もまた含まれる。

【 0 0 5 0 】

既に記載したような、Fc部分およびNkx2-C4ポリペプチドから作製されるものなどの、融合タンパク質もまた、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するための、ハイ・スループットなスクリーニング・アッセイのために使用することができる(D. Bennett et al., J. Mol. Recognition, 8:52~58(1995); ならびにK. Johanson et al., J. Biol. Chem., 270(16):9459~9471(1995)参照)。

【 0 0 5 1 】

スクリーニング技術

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および該ポリペプチドに対する抗体はまた、細胞内におけるmRNAおよびポリペプチドの産生に対する、添加された化合物の影響を検出するためのスクリーニング方法を形成するために使用することができる。例えば、当該分野で公知の標準的な方法によって、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を使用して、ポリペプチドの分泌または細胞結合している濃度を測定するために、ELISAアッセイを構築することができる。これは、適当に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を阻害または増強することができる薬剤(また、それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる)を発見するために使用することができる。

【 0 0 5 2 】

本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の標準的な受容体結合手法を通して、存在する場合には、膜結合型または可溶性の受容体を同定するために使用することができる。これらには、それに限定されないものの、ポリペプチドを、放射性同位体(例えば、 ^{125}I)で標識、化学修飾(例えば、ビオチン化され)、あるいは検出または精製に好適なペプチド配列と融合して、そして推定される受容体の供給源(細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液)とインキュベーションする、リガンド結合ならびにクロスリンク・アッセイが含まれる。他の方法に

は、表面プラズモン共鳴および分光測定法などの、生物物理学的技術が含まれる。これらのスクリーニング方法はまた、存在する場合には、ポリペプチドのその受容体に対する結合と競合する、該ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するために使用することができる。かかるアッセイを行うための標準的な方法は、当該分野では十分に理解されている。

【0053】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体、あるいは、ある場合には、該ポリペプチド自体のリガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、場合により、例えば、該リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメント；あるいは本発明のポリペプチドに結合するものの、応答を誘発せず、その結果、ポリペプチドの活性が妨げられる、小分子が含まれる。

【0054】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術およびNkx2-C4遺伝子の使用を含んでもよい。トランスジェニック動物を構築する手法は、十分に確立されている。例えば、受精した卵母細胞の雌性前核へのマイクロインジェクション、移植前または移植後の胚へのレトロウイルス移入、エレクトロポレーションなどによって、遺伝子操作された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入を通して、Nkx2-C4遺伝子を導入することができる。特に有用なトランスジェニック動物は、その動物のゲノム内において、動物の遺伝子がヒトの等価体によって置き換えられている、所謂「ノック・イン」動物である。ノック・イン・トランスジェニック動物は、医薬探索のプロセスにおいて、化合物はヒトの標的に対して特異的であるという、標的の妥当性検証用に有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、内因性DNA配列によってコードされている、本発明のポリペプチドに対する動物オルソログの発現が細胞内で部分的または完全に無効とされている、所謂「ノック・アウト」動物である。遺伝子のノック・アウトは、技術の限界の結果として、特異的な細胞または組織を対象とする、特定の細胞または組織においてのみ起きていてもよく、あるいは、動物内の全て、または実質的に全ての細胞において生じててもよい。トランスジェニック動物の手法はまた、導

入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に供するために発現させられる動物全体の発現 - クローニング・システムを提供する。

【0055】

上記の方法において使用されるスクリーニング・キットは、本発明のさらなる形態をなす。かかるスクリーニング・キットは、

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現している組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現している細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；

を含んでなり、好ましくは、前記のポリペプチドは、配列番号：2または配列番号：4のものである。

【0056】

かかるキット何れの中においても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的な構成要素を構成することは理解される。

【0057】

(用語集)

下記の定義は、本明細書中で既に頻繁に使用されているいくつかの用語の理解を容易にするために提供される。

【0058】

本明細書中に用いられる「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、ならびにヒト化抗体、同様にFabフラグメントをも包含し、Fabまたは他の免疫グロブリンの発現ライブラリー生成物をも包含する。

【0059】

「単離(された)」は、その天然の状態から、「ヒトの手によって」変化していること、すなわち、自然界に存在する場合、その本来の環境から変化、または移動されているか、あるいは、その両方であることを意味する。例えば、生きた生物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離」されてはいないが、その天然状態の共存物質から分離された、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、この用語の本明細書中での用法に従うと、「単離」され

ている。さらに、形質転換、遺伝子操作、または何らかの他の組換え方法によって、生物中に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その生物が生存または非生存かのいずれでも、前記生物中に依然として存在している場合でさえ、「単離」されている。

【0060】

「ポリヌクレオチド」は、一般には、非改変型または改変型のRNAあるいはDNAであってもよい、任意のポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)を指す。「ポリヌクレオチド」には、限定ではないものの、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖と二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖、または、より典型的には、二本鎖の、あるいは、一本鎖と二本鎖の領域の混合物であってもよい、DNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子が含まれる。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、あるいはRNAとDNAとの両方を含んでなる三重鎖領域をもいう。用語「ポリヌクレオチド」はまた、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。「修飾(された)」塩基には、例えば、トリチル化された塩基、ならびに、イノシンなどの非通常型の塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに対して行うことができ、従って、「ポリヌクレオチド」は、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態と同様に、自然界に典型的に見出されるような、ポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態をも包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと称される、比較的短いポリヌクレオチドをも包含する。

【0061】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合(すなわち、ペプチド等配電子体)によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含んでなるポリペプチドのいずれをも指す。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと広く呼ばれる短い鎖、ならびに、一般にはタンパク質と呼ばれる、より長い鎖の双方ともをいう。ポリペプチドは、遺伝子によってコ

ードされる20種のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することができる。「ポリペプチド」には、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、あるいは当該分野で周知の化学的な修飾方法のいずれかによって、修飾がなされたアミノ酸配列が含まれる。かかる修飾は、基本的な教本、およびより詳細な専門書、ならびに数多くの研究文献中に、広く記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポリペプチド内のいずれの位置に生じさせることもできる。同じタイプの修飾が、所与ポリペプチド内のいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在してもよいことが理解される。また、所与のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含んでもよい。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝がなされてもよく、また、分枝を有する、または有していない、環状であってもよい。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、翻訳に続く天然のプロセスに起因しても、あるいは合成的方法によって作製されてもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ビオチン化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、クロス・リンク形成、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GP I・アンカー形成、ヒドロキシ化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファー・RNA媒介付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins - Structures and Molecular Properties、第2版、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、New York、1993; Wold, F.、翻訳後のタンパク質修飾: 全体像および展望、1~12、Post-translational Covalent Modification of Proteins、B. C. Johnson編、Academic Press、New York、1983; Seifter et al.、**「タンパク質修飾および非タンパク質**

補助因子の分析」、Meth. Enzymol.、182、626～646、1990；Rattan et al.、「タンパク質合成：翻訳後修飾およびエーシング」、Ann. NY Acad. Sci.、663、48～62、1992参照）。

【0062】

ポリペプチド配列の「フラグメント」は、基準の配列よりも短いものの、基準となるポリペプチドと同一の生物学的な機能または活性を本質的に保持しているポリペプチド配列をいう。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号：1または配列番号：3の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

【0063】

「変異体」は、基準となるポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるものの、その本質的な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、基準となるポリヌクレオチドに対して、塩基配列に相違がある。変異体の塩基配列における変異は、基準となるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させても、させなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、下記に説明するように、基準の配列によってコードされるポリペプチド中における、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端の短縮化を引き起こしてもよい。ポリペプチドの典型的な変異体は、基準となるポリペプチドに対して、アミノ酸配列に相違がある。一般に、改変は、基準となるポリペプチドおよび変異体の配列が全体的には非常に類似し、そして多くの領域において同一となるように制限される。変異体ならびに基準となるポリペプチドは、アミノ酸配列において、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組合せによって相違してもよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるアミノ酸残基であっても、なくてもよい。典型的な、保存的置換には、Gly、Ala； Val、Ile、Leu； Asp、Glu； Asn、Gln； Ser、Thr； Lys、Arg； ならびにPheおよびTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子などの天然に存在するものであってもよく、あるいは天然では存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオ

チドおよびポリペプチドの天然には存在しない変異体は、変異誘発方法によって、あるいは直接合成によって作製することもできる。また、1つまたは複数の翻訳後の修飾、例えば、グリコシル化、リン酸化、メチル化、ADP-リボシル化などを有するポリペプチドも、また変異体には含まれる。実施態様には、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化、ならびにC末端グリシンの修飾が含まれる。

【0064】

「対立遺伝子」は、ゲノム中の所与の遺伝子座に存在する遺伝子の、2つまたはそれ以上の選択的な形態の1つをいう。

【0065】

「多型」は、集団内における、ゲノムにおける所与の位置における塩基配列（仮に関連する場合には、コードされるポリペプチド配列）の変動をいう。

【0066】

「単一塩基多型」(SNP)は、集団内においてゲノム内の1つの塩基位置における、塩基変動の発生をいう。SNPは、遺伝子内で、あるいはゲノムの遺伝子間領域内で起こってもよい。SNPは、対立遺伝子特異的増幅(ASA)を使用してアッセイすることができる。該プロセスには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーが、アッセイされる多型に対して、逆方向に相補となるように使用される。この共通プライマーは、多型な塩基から50bpから1500bpの間で隔たったものとできる。それ以外の2つ（またはそれ以上）のプライマーは、最後の3'塩基が、多型を構成する2つ（またはそれ以上）の対立遺伝子の1つと一致するように変化している点を除いて、互いに同一である。そして、それぞれ、共通プライマーおよび1つの対立遺伝子特異的プライマーを使用して、2つ（またはそれ以上）のPCR反応を、サンプルDNAについて行う。

【0067】

本明細書中で使用されている「スプライス変異体」は、同じゲノムDNA配列から一旦転写され、ただし、択一的なRNAスプライシングを受けている、RNA分子から作製されたcDNA分子をいう。択一的なRNAスプライシングは、

一般には、イントロンを除くために、一次RNA転写物がスプライシングを受け
る際に生じ、それぞれ、異なるアミノ酸配列をコードしてもよい、1つ以上のm
RNA分子の産生を引き起こす。スプライス変異体の用語はまた、上記のcDNA
A分子によってコードされるタンパク質をもいう。

【0068】

「同一性」は、その配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリ
ペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の間における相互関係を反
映している。一般に、同一性は、対比がなされている配列の長さにならって、2
つのポリヌクレオチド配列、あるいは2つのポリペプチド配列の、それぞれ塩基
毎またはアミノ酸毎の厳密な一致をいう。

【0069】

「%同一性」 - 正確な一致が存在しない配列については、「%同一性」を決定
することができる。一般に、対比すべき2つの配列を、配列間で最大の相関を与
えるようにアラインメントされる。これには、アラインメントの程度を高めるた
めに、「ギャップ」をいずれか一方の配列または両方の配列に挿入することを含
んでもよい。%同一性は、比較されている配列のそれぞれの全長にならって、決
定してもよく（所謂、全体的なアラインメント）、同じ長さまたは非常に類似す
る長さの配列に対して、特に適している；あるいは、より短い、限定された長さ
にならって、決定してもよく（所謂、局所的なアラインメント）、不ぞろいな長
さの配列において、より好適である。

【0070】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列の間における関係に対する、より精巧
な、さらなる尺度である。一般に、「類似性」は、残基毎に基づき、（同一性に
関してと、同様に）比較されている配列それぞれからの、相互に対をなす残基間
における正確な一致だけでなく、正確な一致が存在しない場合にも、進化的な基
準に基づいて、1つの残基は、他方に対する適当な置換であるかどうかをも考慮
する、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸間での比較を意味する。この蓋然性は、
付随した「スコア」を有し、2つの配列の「%類似性」は、それに基づき決定す
ることができる。

【0071】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法は、当該分野では周知となっている。従って、例えば、ウイスコンシン配列分析パッケージバージョン 9.1 (Devereux J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12, 387~395, 1984; Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin, 米国) 中の利用可能なプログラム、例えば、BESTFIT およびGAP プログラムを、2つのポリヌクレオチド間の%同一性、ならびに2つのポリペプチド配列間の%同一性および%類似性を決定するために使用してもよい。BESTFITは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム (J. Mol. Biol., 147, 195~197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482~489, 1981) を使用して、2つの配列間における、類似性の最も良い1つの領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の比較に対してより適しており、該プログラムは、より短い配列は、より長いものの一部を表すことを仮定している。一方、GAPは、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズム (J. Mol. Biol., 48, 443~453, 1970) に従って、「最大の類似性」を見出しつつ、2つの配列をアラインメントする。GAPは、ほぼ同じの長さであり、また、アラインメントが長さ全体にわたって期待される配列の比較に対してより適している。好ましくは、比較されるものを、最適にアラインメントするための、各プログラムにおいて使用される「ギャップ加重」および「長さ加重」のパラメーターは、それぞれ、ポリヌクレオチド配列に対しては、50および3であり、ポリペプチド配列に対しては、12および4である。好ましくは、比較されている2つの配列を最適にアラインメントした上で、%同一性および類似性を決定する。

【0072】

配列間の同一性および/または類似性を決定するための他のプログラムもまた、当該分野では知られており、例えば、BLASTファミリーのプログラム (Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215,

403~410、1990; Altschul S.F. et al., Nucleic Acids Res., 25:389~3402、1997; National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Bethesda, Maryland, 米国) から入手することができ、また www.ncbi.nlm.nih.gov の NCBI のホームページからアクセス可能である)、および FASTA (Pearson W.R., Methods in Enzymology, 183, 63~99、1990; Pearson W.R. および Lipman D.J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 2444~2448、1988; ウィスコンシン配列分析パッケージの一部として入手可能である)。

【0073】

好ましくは、BLOSUM62 アミノ酸置換行列 (Henikoff S and Henikoff J.G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 10915~10919、1992) を、比較の前に、ヌクレオチド配列をアミノ酸配列に予め翻訳する場合をも含み、ポリペプチド配列の比較において使用する。

【0074】

好ましくは、プログラム BESTFIT が、基準とするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して、検討するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用され、前に記載したように、検討と基準とする配列とは、最適にアラインメントされ、また、プログラムのパラメーターは、暫定の値に設定されている。

【0075】

「同一性指標」は、候補配列 (ポリヌクレオチドまたはポリペプチド) と基準の配列とを比較するために使用することができる、配列関連性の尺度である。すなわち、例えば、基準とするポリヌクレオチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指標を有する候補ポリヌクレオチド配列は、該候補ポリヌクレオチド配列は、基準の配列の各100塩基あたり平均して5個までの相違を含んでもよい点を除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つの塩基欠

失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリヌクレオチド配列の5'または3'末端部位に、あるいはこれら末端部位の間の任意な位置で、基準配列内の塩基間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中で点在して、起こってもよい。換言すると、基準となるポリヌクレオチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内の塩基100個毎に、平均して5個までが、任意の組合せで、欠失、置換または挿入されていてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0076】

同様に、ポリペプチドの場合には、基準のポリペプチド配列と比較したときに、例えば、0.95の同一性指標を有する候補ポリペプチド配列は、基準の配列の各100アミノ酸あたり、平均して5個までの違いを該ポリペプチド配列が含んでもよいことを除いて、基準の配列と同一である。かかる相違は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、保存的ならびに非保存的な置換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの相違は、基準となるポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシ末端部位に、あるいはこれら末端部位間の任意の位置に、基準配列内のアミノ酸間に個々に、あるいは基準配列内において1つまたは複数の連続した群中に点在して、起こってもよい。換言すると、基準のポリペプチド配列と比較した際、0.95の同一性指標を有するポリペプチド配列を得るためには、既に記載したように、基準配列内のアミノ酸の100個毎に、平均して5個まで、任意の組合せで、欠失、置換または挿入がなされてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要に応じて変更して適用される。

【0077】

塩基またはアミノ酸の相違数と同一性指標との関係は、下記の式で表記でき、

$$n_a = x_a - (x_a \cdot I)$$

式中、

n_a は、塩基またはアミノ酸の相違数であり、
 x_a は、配列番号：1 または配列番号：3、あるいは配列番号：2 または配列番号：4 における塩基またはアミノ酸のそれぞれの総数であり、
 I は、同一性指標であり、
 $\cdot$ は、乗算演算子に対する記号であり、
 その際、 x_a と I との非整数の積は、 x_a から減ずるに先立ち、最も近い整数に切り捨てられる。

【0078】

「ホモログ」は、基準の配列に対して、高度の配列関連性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を示すために、当該分野で使用されている一般的な用語である。かかる関連性は、既に定義されているように、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって、定量化することもできる。この総称的な用語には、「オルソログ」および「パラログ」の用語が含まれる。「オルソログ」は、別の種中における、該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価体であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、機能的に類似している、同じ種内にあるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0079】

「融合タンパク質」は、2つの、関連しない、融合された遺伝子またはそのフラグメントによってコードされるタンパク質をいう。その例が、米国特許第5541087号、米国特許第5726044号に開示されている。Fc-Nkx2-C4の場合、融合タンパク質の一部として、免疫グロブリンのFc領域の使用は、治療に使用する際のかかる融合タンパク質の薬物動態学的性質を改善するため、ならびに、二量体型のNkx2-C4を形成させるために、FcNkx2-C4または該Nkx2-C4の断片の機能的発現を行う上で好都合である。Fc-Nkx2-C4のDNA構築物は、5'から3'の方向に、分泌カセット、すなわち、哺乳動物細胞からの細胞外への輸送を誘起するシグナル配列、融合パートナーとして、免疫グロブリンのFc領域フラグメントをコードするDNA、およびNkx2-C4をコードするDNAまたはその断片を含んでなる。ある用途

では、融合タンパク質の残部には手を触れることなく、機能的なFc側を変異させ、その固有的な機能的性質（補体結合、Fc受容体結合）を変える、あるいは発現後にFc部分を完全に除くことを可能とすることが望ましい。

【0080】

特許および特許出願に限らず、これらを含む、本明細書中で引用されている刊行物および参考文献の全ては、十分に述べているように、個々の刊行物または参考文献を、参照して組み込むために、明示的かつ個別的に示唆されているように、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。本出願が優先権を主張する特許出願はいずれも、先に刊行物および参考文献に関して記載したと同様に、その全部を、参照することで、本明細書中に組み込まれる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> Novel human NK-2 homeobox transcription factor

<130> Nkx2-C4CWws

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 903

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

25 <400> 1

atg ctg ctg agc ccc gtc acc tcc acc ccc ttc tcg gtc aag gac atc 48

Met Leu Leu Ser Pro Val Thr Ser Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp Ile

1 5 10 15

30 ctg cga ctg gag cgc gag cgg agc tgc ccc gcg gct tcg cca cat ccg 96

Leu Arg Leu Glu Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ala Ser Pro His Pro

20 25 30

cgg gtg cgg aag agc ccg gaa aac ttt cag tac ctg aga atg gac gca 144

35 Arg Val Arg Lys Ser Pro Glu Asn Phe Gln Tyr Leu Arg Met Asp Ala

35 40 45

gag ccg cga ggg tca gag gtt cac aac gct ggt ggc ggc ggc ggt gac 192

40 Glu Pro Arg Gly Ser Glu Val His Asn Ala Gly Gly Gly Gly Gly Asp

50 55 60

aga aag ctg gat ggt tcg gag cct cct ggg ggt tcc tgt gag gca gtc 240

Arg Lys Leu Asp Gly Ser Glu Pro Pro Gly Gly Ser Cys Glu Ala Val

65 70 75 80

45 ttg gag atg gac gcg gaa cgg atg ggg gag cca cag ccc ggc ctg aac 288

Leu Glu Met Asp Ala Glu Arg Met Gly Glu Pro Gln Pro Gly Leu Asn

85 90 95

50 gcg gcc tcg ccc ctc ggc ggc ggg acc agg gtg cca gag cgc ggc gtt 336

Ala Ala Ser Pro Leu Gly Gly Gly Thr Arg Val Pro Glu Arg Gly Val

100 105 110

ggc aac agc ggc gac agc gtg cgg ggt ggc cgc tcg gag cag ccc aag 384

55 Gly Asn Ser Gly Asp Ser Val Arg Gly Gly Arg Ser Glu Gln Pro Lys

115 120 125

gcg cgg caa cga cgg aag ccg cgc gtg ctc ttt tcg cag gcg cag gtg 432

60 Ala Arg Gln Arg Arg Lys Pro Arg Val Leu Phe Ser Gln Ala Gln Val

130 135 140

	ctg gcc ctg gag cgg cgc ttc aag cag cag cgg tac ctg tca gcg ccc	480
	Leu Ala Leu Glu Arg Arg Phe Lys Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Ala Pro	
	145 150 155 160	
5	gag cgc gag cac ctg gcc agc gcg ctg cag ctc acg tcc acg cag gtc	528
	Glu Arg Glu His Leu Ala Ser Ala Leu Gln Leu Thr Ser Thr Gln Val	
	165 170 175	
10	aag atc tgg ttc cag aac cga cgc tac aaa tgc aag aga cag cgc cag	576
	Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Cys Lys Arg Gln Arg Gln	
	180 185 190	
15	gac aag tgc ctg gaa ctg gct ggc cac cct cta acg ccg cgc cga gta	624
	Asp Lys Ser Leu Glu Leu Ala Gly His Pro Leu Thr Pro Arg Arg Val	
	195 200 205	
20	gct gtg ccc gtc ctg gtg cgc gat ggc aag ccc tgc ctg ggc ccc ggg	672
	Ala Val Pro Val Leu Val Arg Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Pro Gly	
	210 215 220	
25	ccc ggc gca cct gcc ttc ccc agc ccc tac agt gca gca gtg tgc ccc	720
	Pro Gly Ala Pro Ala Phe Pro Ser Pro Tyr Ser Ala Ala Val Ser Pro	
	225 230 235 240	
30	tac tct tgc tac gga ggc tac agc gga gca ccc tac ggc gca ggc tac	768
	Tyr Ser Cys Tyr Gly Tyr Ser Gly Ala Pro Tyr Gly Ala Gly Tyr	
	245 250 255	
35	ggc acc tgc tac gcg ggc gcg ccc tgc ggt cct gcg cca cac aca cca	816
	Gly Thr Cys Tyr Ala Gly Ala Pro Ser Gly Pro Ala Pro His Thr Pro	
	260 265 270	
40	ctg gcc agc gcg ggc ttc gga cac ggt ggc cag aat gcc acc ccg cag	864
	Leu Ala Ser Ala Gly Phe Gly His Gly Gly Gln Asn Ala Thr Pro Gln	
	275 280 285	
45	ggc cat ctg gca gcc acg ctg cag ggt gtc agg gcc tgg	903
	Gly His Leu Ala Ala Thr Leu Gln Gly Val Arg Ala Trp	
	290 295 300	
	<210> 2	
	<211> 301	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
50	Met Leu Leu Ser Pro Val Thr Ser Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp Ile	
	1 5 10 15	
	Leu Arg Leu Glu Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ala Ser Pro His Pro	
	20 25 30	
55	Arg Val Arg Lys Ser Pro Glu Asn Phe Gln Tyr Leu Arg Met Asp Ala	
	35 40 45	
60	Glu Pro Arg Gly Ser Glu Val His Asn Ala Gly Gly Gly Gly Gly Asp	
	50 55 60	
	Arg Lys Leu Asp Gly Ser Glu Pro Pro Gly Gly Ser Cys Glu Ala Val	

	65		70		75		80	
	Leu	Glu	Met	Asp	Ala	Glu	Arg	Met
					85			Gly
5								90
	Ala	Ala	Ser	Pro	Leu	Gly	Gly	Gly
				100				105
								110
10	Gly	Asn	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Arg
			115					120
								125
	Ala	Arg	Gln	Arg	Arg	Lys	Pro	Arg
							135	Val
								140
15	Leu	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Phe	Lys
								150
								155
	Glu	Arg	Glu	His	Leu	Ala	Ser	Ala
								165
20								170
								175
	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg
								180
								185
25	Asp	Lys	Ser	Leu	Glu	Leu	Ala	Gly
								195
								200
	Ala	Val	Pro	Val	Leu	Val	Arg	Asp
								210
								215
30	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Phe	Pro	Ser
								225
								230
	Tyr	Ser	Cys	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Ser
								245
35								250
	Gly	Thr	Cys	Tyr	Ala	Gly	Ala	Pro
								260
								265
40	Leu	Ala	Ser	Ala	Gly	Phe	Gly	His
								275
								280
	Gly	His	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gln
								290
								295
45								300
	<210> 3							
	<211> 843							
	<212> DNA							
50	<213> Homo sapiens							
	<220>							
	<221> CDS							
	<222> (1)..(843)							
55	<400> 3							
	atg	ctg	ctg	agc	ccc	gtc	acc	tcc
								acc
								ccc
								ttc
								tcg
								gtc
								aag
								gac
								atc
	Met	Leu	Leu	Ser	Pro	Val	Thr	Ser
								Pro
								Phe
								Ser
								Val
								Lys
								Asp
								Ile
60								
	ctg	cga	ctg	gag	cgc	gag	cgg	agc
								tgc
								ccc
								gcg
								gct
								tcg
								cca
								cat
								ccg

	Leu	Arg	Leu	Glu	Arg	Glu	Arg	Ser	Cys	Pro	Ala	Ala	Ser	Pro	His	Pro	
				20					25					30			
5	cgg	gtg	cgg	aag	agc	ccg	gaa	aac	ttt	cag	tac	ctg	aga	atg	gac	gca	144
	Arg	Val	Arg	Lys	Ser	Pro	Glu	Asn	Phe	Gln	Tyr	Leu	Arg	Met	Asp	Ala	
			35					40					45				
10	gag	ccg	cga	ggg	tca	gag	gtt	cac	aac	gct	ggt	ggc	ggc	ggc	ggt	gac	192
	Glu	Pro	Arg	Gly	Ser	Glu	Val	His	Asn	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	
			50				55					60					
15	aga	aag	ctg	gat	ggc	tgc	gag	cct	ccc	ggc	ctg	aac	gcg	gcc	tgc	ccc	240
	Arg	Lys	Leu	Asp	Gly	Ser	Glu	Pro	Pro	Gly	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Pro	
			65			70					75					80	
20	ctc	ggc	ggc	ggg	acc	agg	gtg	cca	gag	cgc	ggc	gtt	ggc	aac	agc	ggc	288
	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Val	Pro	Glu	Arg	Gly	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	
					85					90					95		
25	gac	agc	gtg	cgg	ggc	ggc	cgc	tgc	gag	cag	ccc	aag	gcg	cgg	caa	cga	336
	Asp	Ser	Val	Arg	Gly	Gly	Arg	Ser	Glu	Gln	Pro	Lys	Ala	Arg	Gln	Arg	
				100					105				110				
30	cgg	aag	ccg	cgc	gtg	ctc	ttt	tgc	cag	gcg	cag	gtg	ctg	gcc	ctg	gag	384
	Arg	Lys	Pro	Arg	Val	Leu	Phe	Ser	Gln	Ala	Gln	Val	Leu	Ala	Leu	Glu	
			115					120					125				
35	cgg	cgc	ttc	aag	cag	cag	cgg	tac	ctg	tca	gcg	ccc	gag	cgc	gag	cac	432
	Arg	Arg	Phe	Lys	Gln	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ser	Ala	Pro	Glu	Arg	Glu	His	
			130				135					140					
40	ctg	gcc	agc	gcg	ctg	cag	ctc	acg	tcc	acg	cag	gtc	aag	atc	tgg	ttc	480
	Leu	Ala	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	Ser	Thr	Gln	Val	Lys	Ile	Trp	Phe	
			145			150					155					160	
45	cag	aac	cga	cgc	tac	aaa	tgc	aag	aga	cag	cgc	cag	gac	aag	tgc	ctg	528
	Gln	Asn	Arg	Arg	Tyr	Lys	Cys	Lys	Arg	Gln	Arg	Gln	Asp	Lys	Ser	Leu	
					165					170					175		
50	gaa	ctg	gct	ggc	cac	cct	cta	acg	ccg	cgc	cga	gta	gct	gtg	ccc	gtc	576
	Glu	Leu	Ala		His	Pro	Leu	Thr	Pro	Arg	Arg	Val	Ala	Val	Pro	Val	
				180					185					190			
55	ctg	gtg	cgc	gat	ggc	aag	ccc	tgc	ctg	ggc	ccc	ggg	ccc	ggc	gca	cct	624
	Leu	Val	Arg	Asp	Gly	Lys	Pro	Cys	Leu	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Ala	Pro	
			195					200					205				
60	gcc	ttc	ccc	agc	ccc	tac	agt	gca	gca	gtg	tgc	ccc	tac	tct	tgc	tac	672
	Ala	Phe	Pro	Ser	Pro	Tyr	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Pro	Tyr	Ser	Cys	Tyr	
			210				215					220					
65	gga	ggc	tac	agc	gga	gca	ccc	tac	ggc	gca	ggc	tac	ggc	acc	tgc	tac	720
	Gly	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala	Gly	Tyr	Gly	Thr	Cys	Tyr	
			225			230					235				240		
70	gcg	ggc	ggc	ccc	tgc	ggc	cct	gcg	cca	cac	aca	cca	ctg	gcc	agc	ggc	768
	Ala	Gly	Ala	Pro	Ser	Gly	Pro	Ala	Pro	His	Thr	Pro	Leu	Ala	Ser	Ala	
					245					250					255		
75	ggc	ttc	gga	cac	ggc	ggc	cag	aac	gcc	acc	ccg	cag	ggc	cat	ctg	gca	816
	Gly	Phe	Gly	His	Gly	Gly	Gln	Asn	Ala	Thr	Pro	Gln	Gly	His	Leu	Ala	

260 265 270

gcc acg ctg cag ggt gtc agg gcc tgg
Ala Thr Leu Gln Gly Val Arg Ala Trp
275 280

5

<210> 4
<211> 281
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
15 Met Leu Leu Ser Pro Val Thr Ser Thr Pro Phe Ser Val Lys Asp Ile
1 5 10 15
Leu Arg Leu Glu Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ala Ser Pro His Pro
20 20 25 30
Arg Val Arg Lys Ser Pro Glu Asn Phe Gln Tyr Leu Arg Met Asp Ala
35 40 45
Glu Pro Arg Gly Ser Glu Val His Asn Ala Gly Gly Gly Gly Asp
50 55 60
25 Arg Lys Leu Asp Gly Ser Glu Pro Pro Gly Leu Asn Ala Ala Ser Pro
65 70 75 80
Leu Gly Gly Gly Thr Arg Val Pro Glu Arg Gly Val Gly Asn Ser Gly
30 85 90 95
Asp Ser Val Arg Gly Gly Arg Ser Glu Gln Pro Lys Ala Arg Gln Arg
100 105 110
35 Arg Lys Pro Arg Val Leu Phe Ser Gln Ala Gln Val Leu Ala Leu Glu
115 120 125
Arg Arg Phe Lys Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Ala Pro Glu Arg Glu His
130 135 140
40 Leu Ala Ser Ala Leu Gln Leu Thr Ser Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe
145 150 155 160
Gln Asn Arg Arg Tyr Lys Cys Lys Arg Gln Arg Gln Asp Lys Ser Leu
45 165 170 175
Glu Leu Ala Gly His Pro Leu Thr Pro Arg Arg Val Ala Val Pro Val
180 185 190
50 Leu Val Arg Asp Gly Lys Pro Cys Leu Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro
195 200 205
Ala Phe Pro Ser Pro Tyr Ser Ala Ala Val Ser Pro Tyr Ser Cys Tyr
210 215 220
55 Gly Gly Tyr Ser Gly Ala Pro Tyr Gly Ala Gly Tyr Gly Thr Cys Tyr
225 230 235 240
Ala Gly Ala Pro Ser Gly Pro Ala Pro His Thr Pro Leu Ala Ser Ala
60 245 250 255

843

Ala Thr Leu Gln Gly Val Arg Ala Trp
5 275 280

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/EP 01/04145
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 2 November 1999 (1999-11-02) BIRREN, B. ET AL.: "Human chromosome 4 clone RP11-21366" retrieved from EBI, accession no. AC012574 Database accession no. AC012574 XP002175444 abstract	1,4,5
A	DATABASE EMBL 'Online! 17 May 1996 (1996-05-17) TURBAY, D. ET AL.: "Human transcription factor hCsx mRNA" retrieved from EBI, accession no. HS349621 Database accession no. U34962 XP002175445 abstract	1-7
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 August 2001		Date of mailing of the international search report 06/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/EP 01/04145

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL 'Online! 22 December 1998 (1998-12-22) TATE, G. ET AL.: "Human NKx-2.5 mRNA" retrieved from EBI, accession no. AB021133 Database accession no. AB021133 XP002175446 abstract	1-7
A	DATABASE EMBL 'Online! 3 October 1995 (1995-10-03) HAMDAN, H. ET AL.: "Human thyroid transcription factor-1 (TTF-1) mRNA" retrieved from EBI, accession no. HS337491 Database accession no. U33749 XP002175447 abstract	1-7
A	WO 99 62940 A (COLLATERAL THERAPEUTICS) 9 December 1999 (1999-12-09) abstract; examples 1,2	1-11
A	SCHOTT ET AL: "CONGENITAL HEART DISEASE CAUSED BY MUTATIONS IN THE TRANSCRIPTION FACTOR NKX2-5" SCIENCE, vol. 281, 3 July 1998 (1998-07-03), pages 108-111, XP002125587 WASHINGTON US ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1-7
A	IVENS A ET AL: "THE HUMAN HOMEBOX GENE HOX7 MAPS TO CHROMOSOME 4P16.1 AND MAY BE IMPLICATED IN WOLF-HIRSCHHORN SYNDROME" HUMAN GENETICS, vol. 84, no. 5, 1990, pages 473-476, XP000926612 ISSN: 0340-6717 abstract	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	Application No
PCT/EP 01/04145	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9962940 A	09-12-1999	AU 4321299 A EP 1085910 A	20-12-1999 28-03-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21
	1/21	C 1 2 Q	1/02
	5/10		1/68
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15
	1/68		33/50
G 0 1 N	33/15		33/53
	33/50		
	33/53	C 1 2 N	15/00
			5/00
(71)出願人	Frankfurter Str. 250 , D - 64293 Darmstadt , Fed eral Republic of Ge rmany		A Z Z M Z Z N A A A
(72)発明者	ヴィルム、 クラウディア ドイツ連邦共和国 64291 ダルムシュタ ット ダーリエンヴェーク 24		
F タ-ム(参考)	2G045 AA34 AA35 DA13 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA05 DA11 DA12 EA04 GA11 HA01 HA14 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ03 QQ08 QQ53 QR32 QR55 QR62 QR77 QS25 QS34 QX02 QX07 4B065 AA15X AA26X AA49X AA53X AA60X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74		

专利名称(译)	NK-2同源框转录调控因子		
公开(公告)号	JP2003530873A	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2001578487	申请日	2001-04-11
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	ヴィルムクラウディア		
发明人	ヴィルム、 クラウディア		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/4702 C07K2319/00		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/53.Z C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4B065/AA15X 4B065/AA26X 4B065/AA49X 4B065/AA53X 4B065/AA60X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2000108485 2000-04-19 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了Nkx2-C4多肽和多核苷酸，以及重组产生这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用Nkx2-C4多肽和多核苷酸的方法。