

(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 - 523758

(P2003 - 523758A)

(43)公表日 平成15年8月12日(2003.8.12)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	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 4
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15		1/19	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求(全 44数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 562560(P2001 - 562560)

(86)(22)出願日 平成13年2月20日(2001.2.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月23日(2002.8.23)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/01892

(87)国際公開番号 W001/062779

(87)国際公開日 平成13年8月30日(2001.8.30)

(31)優先権主張番号 00103790.2

(32)優先日 平成12年2月23日(2000.2.23)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト ベシュレンクテル ハフトング  
 MERCK PATENT GESELLSCHAFT 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

(72)発明者 クルクセン、 フランツ - ヴェルネル  
 ドイツ連邦共和国 64367 ミュールタル  
 パーンホフシュトラーセ 39

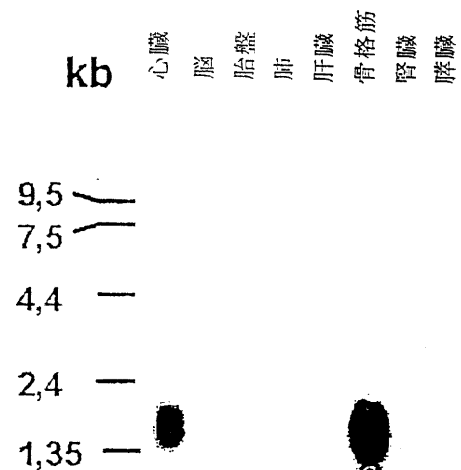
(74)代理人 弁理士 金田 暢之 (外 2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規転写因子CARP - 2

(57)【要約】

CARP - 2 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドならびに組換え法によりそのようなポリペプチドを産生する方法が開示される。また、診断アッセイにおいてCARP - 2 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いる方法も開示される。



CARPアイソフォーム

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 (a) 配列番号1の配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと；

(b) 配列番号2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むポリペプチドと；

(c) 配列番号2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と；

(d) 配列番号2のポリペプチド配列と；

(e) (a)～(d)におけるそのようなポリペプチドのフラグメントおよび変異体と

からなる群より選択されるポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2のポリペプチド配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2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むポリヌクレオチドと；

(b) 配列番号1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と；

(c) 配列番号2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むポリヌクレオチドと；

(d) 配列番号2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と；

(e) 配列番号1の配列または少なくとも15ヌクレオチドを有するそのフラグメントを有する標識プローブにより、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でライブラリ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ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと；

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

(g)(a)～(f)のいずれかの前記ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド配列と；

(h)(a)～(g)のいずれか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、または前記のポリヌクレオチドに対してその全長にわたり相補的であるポリヌクレオチドと  
からなる群より選択されるポリヌクレオチド。

【請求項5】 (a)配列番号1のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドと；

(b)配列番号1のポリヌクレオチドと；

(c)配列番号2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むポリヌクレオチドと；

(d)配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと  
からなる群より選択される、請求項4に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 前記発現ベクターが適合する宿主細胞中に存在するときに、請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドを産生することができるポリヌクレオチドを含む発現系。

【請求項7】 請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドを発現する、請求項6に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項8】 請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドを産生する方法であって、請求項7に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で培養する段階と、ポリペプチドを培地から回収する段階とを含む方法。

【請求項9】 免疫グロブリンFc領域と請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドとからなる融合蛋白質。

【請求項10】 請求項1～3のいずれかに記載の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1～3のいずれかに記載のポリペプチドの機能またはレベル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法であっ

て、

(a) 候補化合物の前記ポリペプチド(または前記ポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白質への結合を、候補化合物に直接または間接的に結合した標識によって、定量的または定性的に測定または検出すること;

(b) 標識競合物質存在下で、候補化合物の前記ポリペプチド(またはポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白質への結合の競合を測定すること;

(c) 候補化合物が前記ポリペプチドの活性化または阻害によって発生するシグナルを生じるかどうかを、前記ポリペプチドを発現する細胞または細胞膜に適切な検出システムを用いて試験すること;

(d) 候補化合物を請求項1~3のいずれかに記載のポリペプチドを含む溶液と混合して混合物を調製し、混合物中の前記ポリペプチドの活性を測定し、かつ混合物の活性を、候補化合物を含まない対照混合物と比較すること;または

(e) 細胞中の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効果を、例えばELISAアッセイを用いて検出すること;および

(f) 生物工学的または化学的標準法に従って前記化合物を産生することとからなる群より選択される方法を含む方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、以下において「新規転写因子(CARP-2)」としばしば呼ばれる、新しく同定されたポリペプチドおよびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、診断においておよび治療上有用となる可能性のあるアゴニスト、アンタゴニストでありうる化合物の同定のためのそれらの使用と、そのようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドの産生とに関する。

**【0002】****(発明の背景)**

創薬プロセスは現在、「機能ゲノム科学」、すなわちハイスループットのゲノム生物学または遺伝子生物学を取り入れ、根本的改革が進められている。治療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のこのアプローチは、「ポジショナルクローニング」に基づく初期のアプローチに速やかに取って代わろうとしている。生体機能または遺伝子の疾患である表現型を同定し、次いでその遺伝子地図上の位置に基づき、担当遺伝子にたどり着くことになる。

**【0003】**

機能ゲノム科学は、現在入手可能な多くの分子生物学データベースから、興味深いと思われる遺伝子配列を同定するために、ハイスループットDNA配列決定法およびバイオインフォマティクスの様々なツールに大きく依存している。創薬のための標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/蛋白質を同定し、特徴付けることが継続して必要とされている。

**【0004】****(発明の概要)**

本発明はCARP-2、特にCARP-2ポリペプチドおよびCARP-2ポリヌクレオチド、組換え物質、ならびにそれらの産生法に関する。そのようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、異なる病因の急性および慢性心不全、心筋梗塞、心臓肥大、不整脈、心筋炎、肺(pulmonary)高血圧、心臓毒性(例えば化学療法による)、冠動脈性心疾患を含む特定の疾患の治療法に関連し

て興味を持たれるが、疾患はこれらに限定されることはない。異なる病因の急性および慢性心不全、心筋梗塞、心臓肥大、不整脈、心筋炎、肺（pulmonary）高血圧、心臓毒性（例えば化学療法による）、冠動脈性心疾患は、以下においては「本発明の疾患」と呼ぶ。さらなる態様において、本発明は、本発明によって提供される物質を用いてアゴニストおよびアンタゴニスト（例えば阻害剤）を同定する方法、ならびに同定された化合物によってCARP-2不均衡に関連する状態を治療する方法に関する。さらなる態様において、本発明は不適当なCARP-2活性またはレベルに関連する疾患を検出するための診断アッセイに関する。

#### 【0005】

（発明の説明）

第一の態様において、本発明はCARP-2ポリペプチドに関する。そのようなポリペプチドには下記のものが含まれる：

- （a）配列番号1の配列を含む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のポリペプチド配列に少なくとも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むポリペプチド；
- （c）配列番号2のポリペプチド配列を含むポリペプチド；
- （d）配列番号2のポリペプチド配列に少なくとも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のポリペプチド配列；および
- （f）配列番号2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の同一性指数を有するポリペプチド配列を有する、またはそのようなポリペプチド配列を含むポリペプチド；
- （g）（a）から（f）におけるそのようなポリペプチドのフラグメントおよび変異体。

#### 【0006】

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの心臓アンキリンリピート転写因子（Cardiac Ankyrin Repeat Transcription

Factors)ファミリーのメンバーであると考えられている。これらはしたがって、CARP2は蛋白質-蛋白質相互作用に關与するアンキリンリピートを含む蛋白質ファミリーのメンバーであるため、興味を持たれる。最も近いホモログであるCARPは公知の転写因子であり、その発現は心臓、骨格筋、および内皮細胞(endothelial cell)に限定されている。

#### 【0007】

CARP-2の生物学的性質は、以下においては「CARP-2の生物活性」または「CARP-2活性」と呼ぶ。好ましくは、本発明のポリペプチドは少なくとも1つのCARP-2の生物活性を示す。

#### 【0008】

本発明のポリペプチドにはまた、すべての対立型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含まれる。そのようなポリペプチドは、保存的もしくは非保存的であってもよい、挿入、欠失、および置換、またはその任意の組合せにより、基準ポリペプチドとは異なる。特に好ましい変異体は、いくつかのアミノ酸、例えば、50~30個、30~20個、20~10個、10~5個、5~3個、3~2個、2~1個または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。

#### 【0009】

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のアミノ酸配列に由来する少なくとも30、50もしくは100個の隣接アミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、または配列番号2のアミノ酸配列から短縮もしくは欠失された少なくとも30、50もしくは100個の隣接アミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを含む。好ましいフラグメントは、CARP-2の生物活性を仲介する生物学的に活性なフラグメントである。これには、類似の活性もしくは改善された活性を持つもの、または望ましくない活性が減少したフラグメントを含む。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のようなフラグメントも好ましい。

#### 【0010】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、対応する完全長ポリペプチドをペプ

チド合成により産生するために用いることもできる。したがって、これらの変異体は本発明の完全長ポリペプチドを産生するための中間体として用いることもできる。本発明のポリペプチドは、「成熟型」蛋白質の形であってもよく、または前駆体もしくは融合蛋白質などのより大きい蛋白質の一部であってもよい。分泌配列もしくはリーダー配列、プロ配列、精製を助ける配列、例えば複数のヒスチジン残基、または組換え産生中の安定性のための追加配列を含む、追加のアミノ酸配列を含むことは多くの場合好都合である。

#### 【0011】

本発明のポリペプチドは任意の好適な方法で、例えば、単離型天然原料、発現系（下記参照）を含む遺伝子操作された宿主細胞からの単離により、もしくは例えば自動ペプチド合成機を用いた化学合成により、またはそのような方法の組合せにより調製することができる。そのようなポリペプチドを調製する方法は、当技術分野においてよく知られている。

#### 【0012】

さらなる態様において、本発明はCARP-2ポリヌクレオチドに関する。そのようなポリヌクレオチドには下記のものが含まれる：

- (a) 配列番号1のポリヌクレオチド配列に対し少なくとも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むポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号1のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号1のポリヌクレオチドに対し少なくとも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のポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号2のポリペプチド配列に対し少なくとも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むポリヌクレオチド；
- (f) 配列番号2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むポリヌクレオチド配列；
- (g) 配列番号2のポリペプチド配列に少なくとも95%、96%、97%、9

8%、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のポリヌクレオチド配列と比較した場合、0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を有する、またはそのようなポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；

(j) 配列番号2のポリペプチド配列と比較した場合、0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99の同一性指数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、またはそのようなポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；および

前述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か、または前述のポリヌクレオチドに、その全長にわたり相補的であるポリヌクレオチド。

#### 【0013】

本発明のポリヌクレオチドの好ましいフラグメントは、配列番号1の配列に由来する少なくとも15、30、50もしくは100個の隣接ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、または配列番号1の配列から短縮もしくは欠失された少なくとも30、50もしくは100個の隣接ヌクレオチドを有する配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。

#### 【0014】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体は、スプライス変異体、対立変異体、および1つまたは複数の一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型を含む。

#### 【0015】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチド変異体であって、いくつか、例えば、50~30個、30~20個、20~10個、10~5個、5~3個、3~2個、2~1個または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含む。

## 【0016】

さらなる態様において、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。したがって下記のRNAポリヌクレオチドが提供される：

(a) 配列番号2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含むRNAポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1のDNA配列のRNA転写物を含むRNAポリヌクレオチド；  
または

(d) 配列番号1のDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；  
およびそれらに対して相補的であるRNAポリヌクレオチド。

## 【0017】

配列番号1のポリヌクレオチド配列は、サイトカイン誘導性核蛋白質に対するヒトmRNA (Chu, W. et al., J. Biol. Chem. 270 (17), 10236~10245 (1995)) と相同性を示す。配列番号1のポリヌクレオチド配列は、配列番号2のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号2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のポリペプチドコーディング配列と同一であってもよく、または配列番号1以外の配列であるが、遺伝暗号の重剰性(縮重)の結果、同じく配列番号2のポリペプチドをコードする配列である。配列番号2のポリペプチドは、サイトカイン誘導性核蛋白質に対するヒトmRNA (Chu, W. et al., J. Biol. Chem. 270 (17), 10236~10245 (1995)) と相同性および/または構造的類似性を有する、心臓アンキリンリピート転写因子ファミリーの他の蛋白質に関係している。

## 【0018】

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機能/性質を有すると予想される。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CARP-2活性を有する。

【0019】

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニング法を用いてヒト心臓細胞中のmRNA由来cDNAライブラリから得ることができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., 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ゲノムDNAライブラリなどの天然原料から得ることもでき、またはよく知られている商業的に利用可能な技法を用いて合成することもできる。

【0020】

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産生に用いるとき、ポリヌクレオチドは成熟ポリペプチドのコーディング配列をそれ自体で、あるいは読み枠中に成熟ポリペプチドのコーディング配列を、リーダーもしくは分泌配列、プレ、もしくはプロまたはプレプロ蛋白質配列、あるいは他の融合ペプチド部分など他のコーディング配列と共に含んでもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を助ける標識配列をコードすることもできる。本発明のこの態様におけるある好ましい実施形態において、標識配列はpQEベクター(Qiagen, Inc.)において提供され、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であるか、またはHAタグである。ポリヌクレオチドは、転写された非翻訳配列、スプライシングシグナルおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位ならびにmRNAを安定化する配列などの非コーディング5'および3'配列を含むこともできる。

【0021】

配列番号1のポリヌクレオチドと等しい、または十分な同一性を有するポリヌクレオチドを、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、または核酸増幅反応(例えばPCR)のプライマーとして用いることもできる。そのような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に対する高い配列類似性、概して少なくとも95%の同一性を有する他の遺伝子(ヒト由来のパラログならびにヒト以外の種由来の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用いることもできる。好ましいプローブおよびプライマーは一般には少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドを含むことになり、少なくとも100ヌクレオチドではないとしても少なくとも50ヌクレオチドを有していてもよい。特に好ましいプローブは30から50個の間のヌクレオチドを有することになる。特に好ましいプライマーは20から25個の間のヌクレオチドを有することになる。

#### 【0022】

ヒト以外の種由来のホモログを含む、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の配列またはそのフラグメント、好ましくは少なくとも15ヌクレオチドを有する標識プローブにより、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でライブラリをスクリーニングする段階と、そのポリヌクレオチド配列を含む完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する段階とを含む方法によって得ることができる。そのようなハイブリダイゼーション技術は当業者にはよく知られている。好ましいストリンジент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リン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、および20マイクログラム/mlの変性切断サケ精子DNAを含む溶液において、42℃での終夜インキュベーションの後、約65℃の0.1×SSC中でのフィルターの洗浄を含む。したがって、本発明は、好ましくは少なくとも100個のヌクレオチド配列を有し、配列番号1の配列またはそのフラグメント、好ましくは少なくとも15ヌクレオチドの標識プローブにより、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でライブラリをスクリーニングすることによって得られる単離ポリヌクレオチドも含む。

#### 【0023】

当業者であれば、多くの場合、単離 cDNA 配列はポリペプチドをコードする領域が 5' 末端まで完全に伸びていない点で不完全であることを理解する。これは、本質的に「プロセシング能」（重合反応中に酵素が鋳型に結合したままでいられる能力の尺度）が低い酵素である逆転写酵素が、第一鎖 cDNA 合成中に mRNA 鋳型の DNA コピーを完了できなかった結果である。

#### 【0024】

完全長 cDNA を得るため、または短い cDNA を伸張するために利用可能であり、当業者によく知られているいくつかの方法、例えば cDNA 末端の迅速増幅 (RACE) 法に基づくものがある (例えば、Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998~9002, 1988)。典型的な例として例えば Marathon (商標) 法 (Clontech Laboratories Inc.) が挙げられるが、最近の技術の改変によってより長い cDNA の検索が著しく単純になった。Marathon (商標) 法では、選択された組織から抽出した mRNA から cDNA を調製し、「アダプター」配列を各末端にライゲートしていた。次いで、遺伝子特異的およびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて核酸増幅 (PCR) を行い、cDNA の「失われた」5' 末端を増幅する。次いで、「ネステッド (nested)」プライマー、すなわち増幅産物の範囲内にアニーリングするよう設計されたプライマー (典型的には、アダプター配列のさらに 3' にアニーリングするアダプター特異的プライマーおよび既知の遺伝子配列のさらに 5' にアニーリングする遺伝子特異的プライマー) を用いて PCR 反応を繰り返す。この反応の生産物を次いで DNA 配列決定により分析し、生産物を既存の cDNA に直接連結して完全な配列を得るか、または 5' プライマーの設計のための新しい配列情報を用いて別の完全長 PCR を行うことにより、完全長 cDNA を構築することができる。

#### 【0025】

本発明の組換えポリペプチドは、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から当業者にはよく知られている方法によって調製することができる。したがって、さらなる態様において、本発明は本発明の 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを

含む発現系と、そのような発現系を有する遺伝子操作された宿主細胞と、組換え法による本発明のポリペプチドの産生とに関する。本発明のDNA構築物由来のRNAを用いてそのような蛋白質を産生するために、無細胞翻訳系を用いることもできる。

#### 【0026】

組換え産生のために、宿主細胞を遺伝子操作して本発明のポリヌクレオチドの発現系またはその一部を組み込むことができる。ポリヌクレオチドは、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrook et al., (同書) などの多くの標準的実験マニュアルに記載の方法によって宿主細胞に導入することができる。宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための好ましい方法には、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲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、カチオン性脂質仲介トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、スクレイブ負荷、バリスティック導入または感染が含まれる。

#### 【0027】

適当な宿主の代表例には、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、放線菌および枯草菌細胞などの細菌細胞；酵母細胞およびコウジカビ属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエS2およびハスモンヨトウ(Spodoptera) Sf9細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293およびボーズ(Bowes)メラノーマ細胞などの動物細胞；ならびに植物細胞が含まれる。

#### 【0028】

多様な発現系、例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来の系を用いることができ、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母染色体因子由来、バキュロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス由来のベクター、ならびにコスミドおよび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遺伝因子由来のものなどのその組合せ由来のベクターが挙げられる。発現系は、発現を調節しかつ引き起こす制御領域を含んでいてもよい。一般に、ポリヌクレオチドを維持、伝播または発現して宿主中でポリペプチドを産生することができる、いかなる系またはベクターも用いることができる。適当なポリヌクレオチド配列は、例えば、Sambrook et al., (同書) に記載のものなどの、よく知られておりルーチンで用いられる様々な技法のいずれによっても、発現系に挿入することができる。適当な分泌シグナルを所望のポリペプチドに組み込んで、翻訳された蛋白質を小胞体の内腔、細胞周辺腔、または細胞外環境に分泌させることができる。これらのシグナルはポリペプチドに内在するものでもよく、または異種シグナルであってもよい。

#### 【0029】

本発明のポリペプチドがスクリーニングアッセイで用いるために発現される場合、ポリペプチドは細胞表面で産生されることが一般に好ましい。この場合、細胞はスクリーニングアッセイで用いる前に回収される。ポリペプチドが培地中に分泌される場合、ポリペプチドを回収し、精製するために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まず細胞を溶解しなければならない。

#### 【0030】

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殿、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よく知られている方法によって、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。精製には高性能液体クロマトグラフィを用いることが最も好ましい。細胞内合成、単離および/または精製中にポリペプチドが変性したときには、蛋白質をリフォールディングさせるためのよく知られている技法を用いて、活性配座を再生することができる。

#### 【0031】

本発明のポリヌクレオチドは、関連遺伝子の突然変異を検出することを通じて

診断試薬として用いることもできる。cDNAおよびゲノム配列中の配列番号1のポリヌクレオチドによって特徴付けられ、機能不全に関連している遺伝子の突然変異型を検出することにより、遺伝子の発現不足、過剰発現、または空間的もしくは時間的発現の変化による、疾患または疾患に対する感受性の診断の一助となりうるか、または診断を決定することができる診断ツールが提供される。遺伝子に突然変異を有する個体を、当技術分野においてよく知られている様々な技法によってDNAレベルで検出することができる。

#### 【0032】

診断に必要な核酸は、血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料などの被験体の細胞から得ることができる。検出のためにゲノムDNAを直接用いてもよく、または分析の前にPCR、好ましくはRT-PCR、もしくは他の増幅法を用いることにより、ゲノムDNAを酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAも同様の方法で用いることができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比べて増幅産物のサイズの変化によって検出することができる。点突然変異は増幅したDNAを標識したCARP-2ヌクレオチド配列にハイブリダイズすることによって同定することができる。完全に一致した配列はリボヌクレアーゼ消化によって、または融点の差によってミスマッチ二本鎖と区別することができる。DNA配列の相違は変性剤を含む、もしくは含まないゲルでのDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって、または直接DNA配列決定によって検出することもできる(例えば、Myers et al., Science (1985) 230:1242)。特定の部位での配列の変化は、リボヌクレアーゼおよびS1保護などのヌクレアーゼ保護アッセイ、または化学的切断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)。

#### 【0033】

CARP-2ポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば遺伝子突然変異の効率的なスクリーニングを行うことができる。そのようなアレイは高密度アレイまたは格子であることが好ましい。アレイ技術による方法はよく知られ、一般的適用性を有して

おり、遺伝子発現、遺伝連鎖、および遺伝的変異性を含む分子遺伝学の様々な問題を検討するために用いることができる（例えば、M. Chee et al., Science, 274, 610~613 (1996) およびそこで引用されている他の文献参照）。

【0034】

異常に低いまたは高いポリペプチドまたはmRNA発現レベルの検出を、本発明の疾患に対する被験体の感受性を診断または決定するために用いることもできる。発現の減少または増加は、例えばPCR、RT-PCRなどの核酸増幅、リボヌクレアーゼ保護、ノーザンブロットングおよび他のハイブリダイゼーション法などのポリヌクレオチド定量のための当技術分野においてよく知られているいかなる方法を用いてRNAレベルで測定することができる。宿主由来の試料中の、本発明のポリペプチドなどの蛋白質レベルを定量するために用いることができるアッセイ法は、当業者にはよく知られている。そのようなアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、結合蛋白質競合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0035】

したがってもう1つの態様において、本発明は下記のものを含む診断キットに関する：

- (a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1のヌクレオチド配列、またはそのフラグメントまたはRNA転写物；
- (b) (a)の配列に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のポリペプチドの抗体。

【0036】

そのようないかなるキットにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的成分を含みうるということが理解される。そのようなキットは、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。

【0037】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体位置決定研究において有用である。この配列は個々のヒト染色体上の特定の位置を特に標的とし、それにハイブリダイズすることができる。本発明に従って染色体に関連する配列のマッピングをすることは、それらの配列を遺伝子関連疾患に相関付ける際の重要な第一段階である。いったん配列を染色体上で正確に位置づけると、染色体上の配列の物理的な位置を遺伝子地図データと相関付けることができる。そのようなデータは、例えばV. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで利用可能)に見いだされる。次いで、同じ染色体領域に位置づけられた遺伝子と疾患との間の関係を連鎖解析により同定する(物理的に隣接する遺伝子の共遺伝)。ゲノム配列(遺伝子フラグメントなど)のヒト染色体上における正確な位置は、放射線ハイブリッドマッピング(Radiation Hybrid (RH) Mapping) (Walter, M. Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J., および Goodfellow, P., (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, Nature Genetics 7, 22~28)により決定することができる。いくつかのRHパネル、例えば、GeneBridge4 RHパネル(Hum Mol Genet 1996 Mar; 5(3): 339~46 A radiation hybrid map of the human genome. Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillet D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN)がResearch Genetics (米国アラバマ州ハンツビル)から入手可能である。このパネルを用いて遺伝子の染色体上の位置を決定するために、RH DNA上の目的遺伝子から設計したプライマーを用いて93回のPCRを行う。これらのDNAはそれぞれ、ハムスター環境で維持したランダムヒトゲノムフラグメントを含

む(ヒト/ハムスターハイブリッド細胞株)。これらのPCRにより目的遺伝子のPCR産物の有無を示す93のスコアが得られる。これらのスコアを、既知の位置のゲノム配列からのPCR産物を用いて得られたスコアと比較する。この比較は<http://www.genome.wi.mit.edu/>で行う。

#### 【0038】

本発明のポリヌクレオチド配列は組織発現研究のための有用なツールでもある。そのような研究は、ポリペプチドをコードするmRNAを検出することにより、組織中のコードされたポリペプチドの発現パターンに関する指標を示しうる、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの調査を可能にする。用いる技法は当技術分野においてよく知られており、cDNAマイクロアレイハイブリダイゼーションなどの、格子上に配列されたクローンに対するインサイチュウハイブリダイゼーション法(Schena et al, Science, 270, 467~470, 1995およびShalon et al, Genome Res, 6, 639~645, 1996)およびPCRなどの核酸増幅法が含まれる。好ましい方法はPerkin Elmerから入手可能なTAQMAN(商標)法を用いる。これらの研究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ことができる。加えて、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の型(例えば、ポリペプチドコード能における変化または調節突然変異を有するもの)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当な発現の役割に対する有用な見通しを提供することができる。そのような不適当な発現は、時間的、空間的または単に量的性質のものでありうる。

#### 【0039】

本発明のポリペプチドは心臓および骨格筋で発現される。

#### 【0040】

本発明のさらなる態様は抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはそれらのフラグメント、あるいはそれらを発現する細胞を、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的な抗体を産生するための免疫原として用いることができる。用語「免疫特異的」は、抗体が従来技術における他の関連ポリペプチドよりも本発明の

ポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

【0041】

本発明のポリペプチドに対して生ずる抗体は、ポリペプチドもしくはエピトープを有するフラグメントまたは細胞を、動物好ましくはヒト以外の動物に、通常のプロトコルを用いて投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体を調製するために、連続細胞株培養によって産生される抗体を提供するいかなる技法も用いることができる。例には、ハイブリドーマ法(Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495~497)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4: 72)およびEBV-ハイブリドーマ法(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77~96, Alan R. Liss, Inc., 1985)が含まれる。

【0042】

米国特許第4946778号に記載のものなどの、一本鎖抗体を産生する技法を、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を産生するために適合させることもできる。同様に、トランスジェニックマウスまたは他の哺乳動物を含む他の生物を用いてヒト化抗体を発現することもできる。

【0043】

前述の抗体を用いて、ポリペプチドを発現するクローンを単離もしくは同定する、またはアフィニティクロマトグラフィによりポリペプチドを精製することもできる。本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて特に本発明の疾患を治療することもできる。

【0044】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドをワクチンとして用いることもできる。したがって、さらなる態様において、本発明は哺乳動物において免疫応答を誘導する方法であって、疾患が個体内ですでに確立され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/または例えば、サイトカイン産生T細胞もしくは細胞傷害性T細胞を含むT細胞免疫応答を起こすのに

十分な本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含む。哺乳動物における免疫応答は、前記動物を本発明の疾患から保護するために抗体を産生するような免疫応答を誘導するために、インビボでポリヌクレオチドの発現を管理し、ポリペプチドをコードするベクターを介して、本発明のポリペプチドを送達することを含む方法によって誘導することもできる。ベクターを投与する1つの方法は、ベクターを粒子のコーティングとして所望の細胞内に加速すること、またはその他による。そのような核酸ベクターはDNA、RNA、修飾核酸、またはDNA/RNAハイブリッドを含むことができる。ワクチンを使用するために、ポリペプチドまたは核酸ベクターは通常、ワクチン調合物（組成物）として提供される。調合物はさらに適当な担体を含んでいてもよい。ポリペプチドは胃で分解されると考えられるため、非経口（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、または皮内注射）で投与することが好ましい。非経口投与に適した調合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および調合物を受容者の血液と等張にするための溶質を含んでいてもよい水性および非水性無菌注射溶液；ならびに懸濁化剤または増粘剤を含んでいてもよい水性および非水性無菌懸濁液が含まれる。調合物は単位用量または多用量容器、例えば、密封アンプルおよびバイアルで提供することもでき、使用直前に無菌液状担体を加えるだけの凍結乾燥状態で保存することもできる。ワクチン調合物は、水中油系および当技術分野において知られている他の系などの、調合物の免疫原性を増強するためのアジュバント系を含んでいてもよい。用量はワクチンの具体的活性によって異なり、通常の実験により容易に決定することができる。

#### 【0045】

本発明のポリペプチドは、1つまたは複数の疾患状態、特に前述の本発明の疾患に関連する、1つまたは複数の生物機能を有する。したがって、ポリペプチドの機能またはレベル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。したがって、さらなる態様において、本発明はポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害するものを同定するための化合物のスクリーニング法を提供する。そのような方法は、前述の本発明の疾患の治療および予防を目的として用い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。化合物は様々な原

料、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリ、化合物コレクション、および天然物の混合物から同定することができる。そのようにして同定されたアゴニストまたはアンタゴニストは、場合により、ポリペプチドの天然もしくは修飾基質、リガンド、受容体、酵素など；その構造的もしくは機能的類似物 (Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5 (1991)) または小分子でありうる。

#### 【0046】

スクリーニング法は、ポリペプチドに対する候補化合物の結合、あるいはポリペプチドまたはその融合タンパク質を含有する細胞または膜に対する候補化合物の結合が、候補化合物に直接または間接的に結合された標識によって単純に測定することができる。あるいは、スクリーニング法は候補化合物のポリペプチドへの標識競合物質 (例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト) に対する競合結合の測定または検出 (定性的または定量的) を含むこともできる。さらに、これらのスクリーニング法は、ポリペプチドを有する細胞に適した検出系を用いて、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によりシグナルを生じるかどうかを試験することもできる。活性化阻害剤は一般に、既知のアゴニスト存在下でアッセイされ、候補化合物存在下でのアゴニストによる活性化への効果を観察する。さらに、スクリーニング法は、候補化合物を本発明のポリペプチドを含む溶液と混合して混合物を生成する段階と、混合物中のCARP-2活性を測定する段階と、混合物のCARP-2活性を候補化合物を含まない対照混合物と比較する段階とを単に含んでいてもよい。

#### 【0047】

本発明のポリペプチドは、従来の低能力スクリーニング法で用いることもでき、同様にハイスループットスクリーニング (HTS) 様式で用いることもできる。そのようなHTS様式は96穴、および最近では384穴マイクロタイタープレートに十分に確立された使用のみならず、Schullek et al., Anal Biochem., 246, 20~29, (1997) に記載のナノウェル法などの、新しく現れつつある方法も含む。

## 【0048】

前述のFc部分およびCARP-2ポリペプチドから生成されるものなどの融合蛋白質を、本発明のポリペプチドのアンタゴニストを同定するためのハイスクリーンングアッセイのために用いることもできる(D. Bennett et al., J Mol Recognition, 8:52~58(1995);およびK. Johanson et al., J Biol Chem, 270(16):9459~9471(1995))。

## 【0049】

## スクリーニング法

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびポリペプチドに対する抗体は、細胞内のmRNAおよびポリペプチドの産生に対する、加えられた化合物の効果を検出するためのスクリーニング法を設定するために用いることもできる。例えば、当技術分野において知られている標準的方法により、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて、分泌された、または細胞関連のポリペプチドのレベルを測定するために、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、ポリペプチドの産生を阻害または促進しうる物質(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)を見いだすために用いることができる。

## 【0050】

本発明のポリペプチドを用いて、当技術分野において知られている標準的受容体結合法により、膜結合または可溶性受容体があればそれを同定することができる。これらには、ポリペプチドを放射性同位体(例えば、 $^{125}\text{I}$ )で標識するか、化学的に修飾する(例えば、ビオチン化)か、または検出もしくは精製に適したペプチド配列に融合し、かつ推定受容体源(細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液)とインキュベートする、リガンド結合および架橋アッセイが含まれるが、これらに限定されることはない。他の方法には、表面プラズモン共鳴および分光法などの生物物理的技法が含まれる。これらのスクリーニング法を用いて、ポリペプチドと、その受容体がある場合にはそれとの結合に競合する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こともできる。そのようなア

ッセイを実施するための標準的方法は当技術分野においてよく理解されている。

#### 【0051】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体または、ある場合には、ポリペプチドの、場合によってはリガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連しているオリゴヌクレオチドもしくは蛋白質、例えば、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が、応答を引き出すことはないため、ポリペプチドの活性が妨げられる小分子が含まれる。

#### 【0052】

スクリーニング法はまた、トランスジェニック技法およびCARP-2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作製する技術は十分に確立されている。例えば、CARP-2遺伝子を、受精卵母細胞の雄性前核へのマイクロインジェクション、着床前もしくは後の胚へのレトロウイルスによる移入、または、電気穿孔法などにより遺伝子修飾された胚幹細胞の注入を通じて宿主未分化胚細胞に導入することもできる。特に有用なトランスジェニック動物は、いわゆる「ノックイン」動物で、その動物のゲノム内で動物遺伝子がヒトの等価遺伝子と置換されている。ノックイントランスジェニック動物は創薬プロセスにおいて、化合物がヒト標的に特異的である場合の標的の有効性確認のために有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、いわゆる「ノックアウト」動物で、本発明のポリペプチドの動物オルソログであり、細胞の内在性DNA配列によってコードされるオルソログの発現が部分的または完全に廃絶されている。遺伝子ノックアウトは、特定の細胞もしくは組織を標的とすることができ、技術に限界があるために特定の細胞もしくは組織でしか起こり得ないか、または動物のすべての、もしくは実質的にすべての細胞で起こりうる。トランスジェニック動物技術は、導入遺伝子が発現されて大量の本発明のポリペプチドが得られる、全動物発現-クローニング系も提供する。

#### 【0053】

前述の方法で使用するためのスクリーニングキットは、本発明のさらなる態様を形成する。そのような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する組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；

を含み、ただしポリペプチドは配列番号2のものであることが好ましい。

【0054】

そのようなキットのいずれにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的な成分を含みうるということが理解される。

【0055】

用語

下記の定義は本明細書前記で頻繁に用いられている特定の用語の理解を助けるために示すものである。

【0056】

本明細書において用いられる「抗体」は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、およびヒト化抗体、ならびにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリの生成物を含むFabフラグメントを含む。

【0057】

「単離された」とは、その天然型から「ヒトの手によって」変更された、すなわち、それが天然に生成する場合、その元の環境から変えられたかもしくは取り出された、またはその両方であることを意味する。例えば、生物中に自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」いないが、その自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、本明細書においてこの用語が用いられるとおり、「単離されて」いる。さらに、形質転換、遺伝子操作または任意の他の組換え法によって生物に導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それが前記生物（生物は生きていても生きていなくてもよい）中に存在しているままであっても、「単離されて」いる。

【0058】

「ポリヌクレオチド」は一般に、いかなる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)をも意味し、非修飾または修飾R

NAまたはDNAであってもよい。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖もしくはより典型的には二本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物であってもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が含まれるが、これらに限定されることはない。加えて、「ポリヌクレオチド」はRNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域を意味する。「ポリヌクレオチド」なる用語には、1つまたは複数の修飾塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性またはその他の理由から主鎖が修飾されているDNAまたはRNAも含まれる。「修飾」塩基には、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどのまれな塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに施すことができる。したがって、「ポリヌクレオチド」は天然に典型的に見いだされる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型、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学型を含む。「ポリヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチドとしばしば呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドも含む。

#### 【0059】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわちペプチドイソステアによって相互に連結された複数のアミノ酸を含む、いかなるポリペプチドも意味する。「ポリペプチド」とは、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般に蛋白質と呼ばれる長鎖の両方を意味する。ポリペプチドは20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。「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、または当技術分野においてよく知られている化学的修飾法のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列が含まれる。そのような修飾は基礎的な教科書や、より詳細な研究書、ならびに膨大な研究文献に詳しく記載されている。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、およびアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのいかなる位置でなされてもよい。所与のポリペプチドのいくつかの部位で、同じ型の修飾が、同程度または異なる程度で存在しうることは理解される。また、所与のポリペプチドは多くの型の修飾を含むことができる。ユビキチン化の

結果、ポリペプチドが分枝してもよく、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、分枝および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスによって生じることもあり、または合成的方法によって調製することもできる。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、ヘム部分の共有結合、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、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白質分解処理、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蛋白質へのアミノ酸の転移RNA仲介による付加、およびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1~12, in Post-translational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., 「Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors」, Meth Enzymol, 182, 626~646, 1990, および Rattan et al., 「Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging」, Ann NY Acad Sci, 663, 48~62, 1992)。

#### 【0060】

ポリペプチド配列の「フラグメント」とは、基準配列よりも短い、基準ポリペプチドと基本的に同じ生物機能または活性を保持しているポリペプチド配列を

意味する。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号1の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列を意味する。

#### 【0061】

「変異体」とは、基準ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、その基本的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意味する。ポリヌクレオチドの典型的変異体は、基準ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なっている。変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準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えることもあれば、変えないこともある。ヌクレオチドの変化によって、後述するとおり、基準配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および短縮が起こることもある。ポリペプチドの典型的変異体は、基準ポリペプチドとアミノ酸配列が異なっている。一般に、変化は限られており、基準ポリペプチドおよび変異体の配列は全体として非常に類似しており、多くの領域で同等である。変異体および基準ポリペプチドは、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アミノ酸配列が異なってもよい。置換または挿入アミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸残基であってもよく、そうでなくてもよい。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生じるものでもよく、または天然に生じ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非天然変異体は、突然変異誘発法または直接的合成によって調製することができる。同様に、変異体として含まれるものには、1つまたは複数の翻訳後修飾、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がある。本発明の実施形態は、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に含まれる。

#### 【0062】

「対立遺伝子」とは、ゲノムの所与の遺伝子座における遺伝子の複数の別の型の1つを意味する。

## 【0063】

「多型」とは、集団内のゲノムの所与の位置におけるヌクレオチド配列（および適切な場合にはコードされたポリペプチド配列）の変型を意味する。

## 【0064】

「一塩基多型」（SNP）とは、集団内のゲノムの1つのヌクレオチドの位置でヌクレオチド変異性が出現することを意味する。SNPはゲノムの1つの遺伝子内で起こることもあれば、遺伝子間領域で起こることもある。SNPは対立遺伝子特異的増幅（ASA）を用いてアッセイすることができる。この方法のためには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーはアッセイする多型に対する逆相補で用いる。この共通プライマーは多型塩基から50から1500bpの間でありうる。他の2つ（またはそれ以上）のプライマーは、最後の3'塩基がゆらいで、多型をなす対立遺伝子の2つ（またはそれ以上）のうちの1つにマッチする以外は、お互いに同等である。次いで、試料DNAに対して2回（またはそれ以上）のPCR反応を、それぞれ共通プライマーと対立遺伝子特異的プライマーの1つを用いて実施する。

## 【0065】

本明細書において用いられる「スプライス変異体」とは、最初は同じゲノムDNA配列から転写されたが、別のRNAスプライシングを受けたRNA分子から生成したcDNAを意味する。別のRNAスプライシングは最初のRNA転写物が、一般にはイントロンの除去のためにスプライシングを受けるときに起こり、その結果、それぞれが異なるアミノ酸配列をコードしうる複数のmRNA分子を生ずる。スプライス変異体なる用語は、前述のcDNA分子によってコードされる蛋白質も意味する。

## 【0066】

「同一性」とは、配列を比較することによって決められた、複数のポリペプチド配列または複数のポリヌクレオチド配列の関係を表す。一般に、同一性とは、比較する配列の全長にわたり、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の、それぞれ厳密なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の対応を意味する。

## 【0067】

「同一性%」 - 厳密な対応がない配列について、「同一性%」を求めることができる。一般に、比較する2つの配列をアライメントし、配列間の最大の相関を得る。この際、一方または両方の配列に「ギャップ」を挿入して、アライメントの程度を高めることもできる。比較する各配列の全長にわたって同一性%を求めることもでき(いわゆる全体的アライメント)、これは長さが同じもしくは非常に近い配列に特に適しており、または短い、規定の長さで求めることもでき(いわゆる局所的アライメント)、これは長さが異なる配列に対しより適している。

## 【0068】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列間の関係のさらに、より高度な尺度である。一般に「類似性」とは、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸の間で、比較する各配列からの残基対の間の厳密な対応(同一性と同じく)だけでなく、厳密な対応がない場合に、進化に基づき、1つの残基が別のものに置換されているかどうかをも考慮に入れて、残基ごとに比較することを意味する。この見込みには関連する「スコア」がありそれから2つの配列の「類似性%」を求めることができる。

## 【0069】

複数の配列の同一性および類似性を比較する方法は、当技術分野においてよく知られている。したがって、例えばWisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux et al, Nucleic Acids Res, 12, 387~395, 1984, Genetics Computer Group, 米国ウィスコンシン州マディソンから入手可能)で利用できるプログラム、例えばBESTFITおよびGAPなるプログラムを用いて2つのポリヌクレオチド間の同一性%や、2つのポリペプチド配列間の同一性%および類似性%を求めることができる。BESTFITはSmithおよびWaterman(J Mol Biol, 147, 195~197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482~489, 1981)の「局所ホモロジー」アルゴリズムを用いており、2つの配列の間の、類似度の最もよい一領域を

見つける。BESTFITは長さが異なる2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列を比較するのにより適しており、このプログラムは短い方の配列が長い方の一部であると仮定する。これに対して、GAPは2つの配列のアライメントを行い、Neddleman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」を見つめる。GAPはほぼ同じ長さの配列を比較するのにより適しており、アライメントは全長にわたって行われると考えられる。各プログラムで用いられるパラメーター「ギャップウェイト(Gap Weight)」および「鎖長ウェイト(Length Weight)」はそれぞれ、ポリヌクレオチド配列では50および3、ポリペプチド配列では12および4であることが好ましい。同一性および類似性%は、比較する2つの配列が最適にアライメントされているときに求めることが好ましい。

#### 【0070】

配列間の同一性および/または類似性を求めるための他のプログラムも当技術分野において知られており、例えば、BLASTプログラムファミリー(Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403~410, 1990、Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389~3402, 1997、米国バイオテクノロジー情報センター(NCBI)、米国メリーランド州ベセスダから入手可能で、NCBIのホームページwww.ncbi.nlm.nih.govでアクセス可能)およびFASTA(Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63~99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444~2448, 1998、Wisconsin Sequence Analysis Packageの一部として入手可能)がある。

#### 【0071】

比較前にヌクレオチド配列をアミノ酸配列にまず翻訳する場合を含む、ポリペプチド配列の比較においては、BLOSUM62アミノ酸置換マトリクス(Henikoff S and Henikoff J G, Proc. Nat. A

cad Sci. USA, 89, 10915~10919, 1992)を用いることが好ましい。

#### 【0072】

基準ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対してクエリーポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の同一性%を求めるために、プログラムBESTFITを用い、クエリーおよび基準配列は最適にアライメントされ、プログラムのパラメーターは前述のとおり、デフォルト値に設定されていることが好ましい。

#### 【0073】

「同一性指数」は、候補配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）と基準配列とを比較するために用いることができる配列の関連性の尺度である。したがって、例えば、基準ポリヌクレオチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指数を有する候補ポリヌクレオチド配列は、候補ポリヌクレオチド配列が基準配列のそれぞれ100ヌクレオチドごとに平均で5つまでの相違を含みうるということを除き、基準配列と同一である。そのような相違は少なくとも1つのヌクレオチド欠失、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より選択される。これらの相違は、基準ポリヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位で、またはこれらの末端位の間のかなる位置でも、基準配列中のヌクレオチドの間で個々に散在して、または基準配列中の1つまたは複数の隣接グループで起こりうる。すなわち、基準ポリヌクレオチド配列と比較して0.95の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、前述のとおり、基準配列のヌクレオチド100個ごとに平均5個までが欠失、置換もしくは挿入される、またはその任意の組合せが起きてよい。同じことが同一性指数の他の値、例えば0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要な変更を加えてあてはまる。

#### 【0074】

同様に、ポリペプチドについては、基準ポリペプチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指数を有する候補ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列が基準配列のそれぞれ100アミノ酸ごとに平均で5つまでの相違を含みうるということを除き、基準配列と同一である。そのような相違は少なくとも1個のアミノ

酸欠失、保存的および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群より選択される。これらの相違は、基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端位で、またはこれらの末端位の間のかなる位置でも、基準配列中のアミノ酸の間で個々に散在して、または基準配列中の1つまたは複数の隣接グループで起こりうる。すなわち、基準ポリペプチド配列と比較して0.95の同一性指数を有するポリペプチド配列を得るためには、前述のとおり、基準配列のアミノ酸100個ごとに平均5個までが欠失、置換もしくは挿入される、またはその任意の組合せが起こってもよい。同じことが同一性指数の他の値、例えば0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要な変更を加えてあてはまる。

#### 【0075】

ヌクレオチドまたはアミノ酸の相違の数と同一性指数との間の関係は下記の式で表すことができる：

$$n_a - x_a \cdot I$$

上式で、

$n_a$ はヌクレオチドまたはアミノ酸の相違の数であり、

$x_a$ は配列番号1または配列番号2における、それぞれヌクレオチドまたはアミノ酸の合計数であり、

$I$ は同一性指数であり、

$\cdot$ は乗法演算子の記号であり、かつ

上式で、 $x_a$ と $I$ との積が非整数となる場合にはいかなる値でも、 $x_a$ から減ずる前に最も近い整数に切り捨てる。

#### 【0076】

「ホモログ」は、基準配列に対し高度の配列関連性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を示すために、当技術分野において用いられる総称である。そのような関連性は、前述のとおり、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を求めることによって定量することができる。「オルソログ」および「パラログ」なる用語も、この総称の範囲内に入る。「オルソログ」とは、もう1つの種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価物であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。「パラログ」とは、同じ種内で機能

的に類似のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

#### 【0077】

「融合蛋白質」とは、2つの、無関係の融合遺伝子またはそのフラグメントによってコードされる蛋白質を意味する。例は米国特許第5541087号、米国特許第5726044号に開示されている。Fc-Carp-2の場合、そのような融合蛋白質を治療に用いるときに、その薬物動態学的性質を改善し、かつ二量体Carp-2を生成するために、融合蛋白質の一部として免疫グロブリンFc領域を用いることは、Fc-Carp-2またはCarp-2のフラグメントの機能的発現を実施する際に有利である。Fc-Carp-2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輸送を引き起こすシグナル配列、融合相手として、免疫グロブリンFc領域フラグメントをコードするDNA、およびCarp-2またはそのフラグメントをコードするDNAを含む。いくつかの使用において、機能的Fcサイドを突然変異させる一方で、融合蛋白質の残りはそのまま残す、または発現後にFc部分を完全に欠失することにより、固有の機能的性質（相補結合、Fc受容体結合）を変更できることが望ましいであろう。

#### 【0078】

特許および特許出願を含むが、これらに限定されることはない、本明細書において引用したすべての出版物および参考文献は、それぞれ個々の出版物または参考文献について、具体的かつ個別に参考として本明細書に組み込むと示しているかのごとくに、その全体を参考として本明細書に組み込む。本出願がそれに対して優先権を主張する、いかなる特許出願も、出版物および参考文献について前述した様式で、その全体を参考として本明細書に組み込む。

#### 【0079】

さらなる実施例

実施例1

ノーザンブロット

ヒト組織由来RNAにハイブリダイズしたCARP-2の放射性32P標識1000bp遺伝子フラグメントを用いた、多組織ノーザンブロット (Clont

ech Laboratories Inc. 米国カリフォルニア州パロアルト)。mRNAサイズはおよそ2 kbと推定されており、心臓および骨格筋で検出された(図1)。

#### 【0080】

##### 実施例2

##### 遺伝子発現分析

様々なヒト由来mRNA (MTE、Clontech Laboratories Inc. 米国カリフォルニア州パロアルト) を、ナイロンメンブレン上にスポットした。メンブレンをCARP-2の放射性<sup>32</sup>Pで標識した1000bp遺伝子フラグメントとハイブリダイズさせた。ヒト由来の61の個々の試料(表1)を試験した。放射能をスキャンし、スポットを定量した(すべての値は最高値設定=100%に補正した)。心臓および骨格筋における発現に加えて、CARP-2は甲状腺でも検出された。心臓内では、CARP-2発現は心房よりも心室でより顕著であることが判明し、高い発現が心室中隔および心尖でも見られた。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

CARP-2の発現パターンを示す表1である。様々なヒト組織および臓器におけるCARP-2ポリペプチドmRNAの発現分析を、実施例2に示すとおり実施した。

##### 【図2】

ノーザンプロット分析を示す図1である。ヒト組織におけるヒトCARP-2の発現を分析するために、ノーザンプロット(clontech)を実施した。約2 kbで、心臓および骨格筋において検出されているバンド。

##### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH  
5 <120> Cariac Ankyrin Repeat Protein 2  
<130> CARP-2FWKWS  
10 <140>  
<141>  
<160> 2  
15 <170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 1002  
<212> DNA  
20 <213> Homo sapiens  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1002)  
25 <400> 1  
atg gac ggc acc atg gag gac tcc gag gcg gtg cag agg gcc aca gcg 48  
Met Asp Gly Thr Met Glu Asp Ser Glu Ala Val Gln Arg Ala Thr Ala  
1 5 10 15  
30 ctc atc gag cag cgg ctg gca cag gag gag gag aat gag aaa ctc cga 96  
Leu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Gln Glu Glu Glu Asn Glu Lys Leu Arg  
20 25 30  
35 gga gac aca cgc cag aag ctg ccc atg gac ttg ctg gtg ctg gag gat 144  
Gly Asp Thr Arg Gln Lys Leu Pro Met Asp Leu Leu Val Leu Glu Asp  
35 40 45  
40 gag aag cac cac ggg gct cag agt gca gcc ctg cag aag gtg aag ggc 192  
Glu Lys His His Gly Ala Gln Ser Ala Ala Leu Gln Lys Val Lys Gly  
50 55 60  
caa gag cgc gtg cgc aag acg tcc ctg gac ctg cgg cgg gag atc atc 240  
Gln Glu Arg Val Arg Lys Thr Ser Leu Asp Leu Arg Arg Glu Ile Ile  
45 65 70 75 80  
gat gtg ggc ggg atc cag aac ctc atc gag ctg cgg aag aaa cgc aag 288  
Asp Val Gly Gly Ile Gln Asn Leu Ile Glu Leu Arg Lys Lys Arg Lys  
85 90 95  
50 cag aag aag cgg gac gct ctg gcc gcc tcg cat gag ccg ccc cca gag 336  
Gln Lys Lys Arg Asp Ala Leu Ala Ala Ser His Glu Pro Pro Pro Glu  
100 105 110  
55 ccc gag gag atc act ggc cct gtg gat gag gag acc ttc ctg aaa gct 384  
Pro Glu Glu Ile Thr Gly Pro Val Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Ala  
115 120 125  
60 gcg gtg gag ggg aaa atg aag gtc att gag aag ttc ctg gct gac ggg 432  
Ala Val Glu Gly Lys Met Lys Val Ile Glu Lys Phe Leu Ala Asp Gly

	130		135		140		
	ggg tca gcc gac acg tgc gac cag ttc cgt cgg aca gca ctg cac cga	480					
	Gly Ser Ala Asp Thr Cys Asp Gln Phe Arg Arg Thr Ala Leu His Arg						
5	145		150		155		160
	gct tcc ctg gaa ggc cac atg gaa atc ctg gag aag ctt cta gat aat	528					
	Ala Ser Leu Glu Gly His Met Glu Ile Leu Glu Lys Leu Leu Asp Asn						
10			165		170		175
	ggg gcc act gtg gac ttc cag gat cgg ctg gac tgc aca gcc atg cat	576					
	Gly Ala Thr Val Asp Phe Gln Asp Arg Leu Asp Cys Thr Ala Met His						
			180		185		190
15	tgg gcc tgc cgc ggg ggc cac tta gag gtg gtg aaa ctt ctg caa agc	624					
	Trp Ala Cys Arg Gly Gly His Leu Glu Val Val Lys Leu Leu Gln Ser						
			195		200		205
	cat gga gca gac acc aat gtg agg gat aag ctg ctg agc acc ccg ctg	672					
20	His Gly Ala Asp Thr Asn Val Arg Asp Lys Leu Leu Ser Thr Pro Leu						
			210		215		220
	cac gtg gca gtc cgg aca ggg cag gtg gag att gtg gag cac ttt cta	720					
	His Val Ala Val Arg Thr Gly Gln Val Glu Ile Val Glu His Phe Leu						
25	225		230		235		240
	tcc ctg gcc ctg gaa atc aat gcc aga gac agg gaa ggg gat act gcc	768					
	Ser Leu Gly Leu Glu Ile Asn Ala Arg Asp Arg Glu Gly Asp Thr Ala						
			245		250		255
30	ctg cat gac gct gtg agg ctc aac cgc tac aaa atc atc aaa ctg ctg	816					
	Leu His Asp Ala Val Arg Leu Asn Arg Tyr Lys Ile Ile Lys Leu Leu						
			260		265		270
35	ctc ctg cat ggg gct gac atg atg acc aag aac ctg gca gga aag acc	864					
	Leu Leu His Gly Ala Asp Met Met Thr Lys Asn Leu Ala Gly Lys Thr						
			275		280		285
	ccg acg gac ctg gtg cag ctc tgg cag gct gat acc cgg cac gcc ctg	912					
40	Pro Thr Asp Leu Val Gln Leu Trp Gln Ala Asp Thr Arg His Ala Leu						
			290		295		300
	gag cat cct gag ccg ggg gct gag cat aac ggg ctg gag ggg cct aat	960					
	Glu His Pro Glu Pro Gly Ala Glu His Asn Gly Leu Glu Gly Pro Asn						
45	305		310		315		320

```

gat agt ggg cga gag acc cct cag cct gtg cca gcc cag tga          1002
Asp Ser Gly Arg Glu Thr Pro Gln Pro Val Pro Ala Gln
5      325                      330
<210> 2
<211> 333
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10
<400> 2
Met Asp Gly Thr Met Glu Asp Ser Glu Ala Val Gln Arg Ala Thr Ala
1      5      10      15
Leu Ile Glu Gln Arg Leu Ala Gln Glu Glu Glu Asn Glu Lys Leu Arg
15     20     25     30
Gly Asp Thr Arg Gln Lys Leu Pro Met Asp Leu Leu Val Leu Glu Asp
35     40     45
Glu Lys His His Gly Ala Gln Ser Ala Ala Leu Gln Lys Val Lys Gly
50     55     60
20 Gln Glu Arg Val Arg Lys Thr Ser Leu Asp Leu Arg Arg Glu Ile Ile
65     70     75     80
Asp Val Gly Gly Ile Gln Asn Leu Ile Glu Leu Arg Lys Lys Arg Lys
85     90     95
Gln Lys Lys Arg Asp Ala Leu Ala Ala Ser His Glu Pro Pro Pro Glu
100    105    110
25 Pro Glu Glu Ile Thr Gly Pro Val Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Ala
115    120    125
Ala Val Glu Gly Lys Met Lys Val Ile Glu Lys Phe Leu Ala Asp Gly
130    135    140
30 Gly Ser Ala Asp Thr Cys Asp Gln Phe Arg Arg Thr Ala Leu His Arg
145    150    155    160
Ala Ser Leu Glu Gly His Met Glu Ile Leu Glu Lys Leu Leu Asp Asn
165    170    175
Gly Ala Thr Val Asp Phe Gln Asp Arg Leu Asp Cys Thr Ala Met His
180    185    190
35 Trp Ala Cys Arg Gly Gly His Leu Glu Val Val Lys Leu Leu Gln Ser
195    200    205
His Gly Ala Asp Thr Asn Val Arg Asp Lys Leu Leu Ser Thr Pro Leu
210    215    220
40 His Val Ala Val Arg Thr Gly Gln Val Glu Ile Val Glu His Phe Leu
225    230    235    240
Ser Leu Gly Leu Glu Ile Asn Ala Arg Asp Arg Glu Gly Asp Thr Ala
245    250    255
Leu His Asp Ala Val Arg Leu Asn Arg Tyr Lys Ile Ile Lys Leu Leu
260    265    270
45 Leu Leu His Gly Ala Asp Met Met Thr Lys Asn Leu Ala Gly Lys Thr
275    280    285
Pro Thr Asp Leu Val Gln Leu Trp Gln Ala Asp Thr Arg His Ala Leu
290    295    300
50 Glu His Pro Glu Pro Gly Ala Glu His Asn Gly Leu Glu Gly Pro Asn
305    310    315    320
Asp Ser Gly Arg Glu Thr Pro Gln Pro Val Pro Ala Gln
325                      330

```

## 【図1】

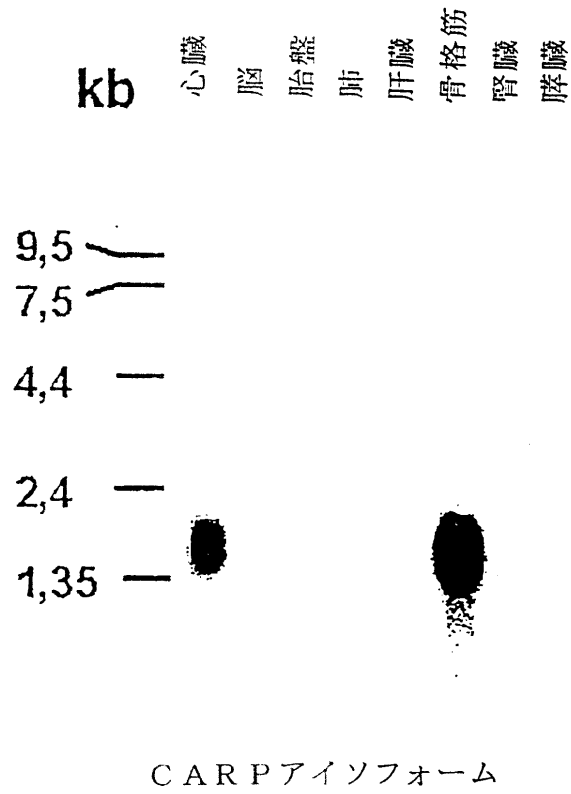
表1

複数のヒト組織	* %	複数のヒト組織	* %
1. 全脳	12.4	31. 胃	11.9
2. 大脳皮質	9.7	32. 十二指腸	10.4
3. 前頭葉	9.4	33. 空腸	7.3
4. 頭頂葉	10.4	34. 回腸	3.1
5. 後頭葉	10.0	35. 回盲部	4.6
6. 側頭葉	10.6	36. 虫垂	3.9
7. 傍中心脳回	14.5	37. 上行結腸	8.9
8. 橋	14.0	38. 横行結腸	5.3
9. 左小脳	9.7	39. 下行結腸	5.8
10. 右小脳	7.5	40. 直腸	6.6
11. 脳梁	6.9	41. 腎臓	18.8
12. 扁桃体	10.2	42. 骨格筋	100.0
13. 尾状核	11.6	43. 脾臓	2.8
14. 海馬	9.6	44. 胸腺	1.2
15. 延髄	11.0	45. 末梢血白血球	n.d.
16. 被殻	13.5	46. リンパ節	5.8
17. 黒質	13.7	47. 骨髄	17.1
18. 側坐核	11.2	48. 気管	12.8
19. 視床	14.3	49. 肺	10.1
20. 下垂体	8.5	50. 胎盤	9.2
21. 脊髄	9.0	51. 膀胱	4.5
22. 心臓	60.4	52. 子宮	n.d.
23. 大動脈	16.0	53. 前立腺	16.1
24. 左心房	29.3	54. 精巣	9.2
25. 右心房	27.3	55. 卵巣	4.2
26. 左心室	60.7	56. 肝臓	12.4
27. 右心室	57.6	57. 膵臓	12.1
28. 心室中隔	79.7	58. 副腎	12.3
29. 心尖	75.7	59. 甲状腺	37.9
30. 食道	24.6	60. 唾液腺	18.0
		61. 乳腺	16.0

\*) ハイブリダイゼーションシグナルを定量し、骨格筋で検出された最高値のパ  
ーセンテージで示した。

【図2】

図1



## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 01/01892
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 C12N15/09 G01N33/68		
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) BIOSIS, SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>1</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EBI 'Online! EMBL; 1 November 1999 (1999-11-01) "Skeletal muscle and cardiac protein (ankyrin repeat domain 2)" Database accession no. Q9WV06 XP002190546 the whole document	1-11
X	-& DATABASE EBI 'Online! 2 July 1999 (1999-07-02) IEVOLELLA C.: "Musculus mRNA for a skeletal muscle and cardiac protein" Database accession no. AJ011118 XP002190924 the whole document	1-11
--- /---		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<sup>2</sup> 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 claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *C* 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 21 February 2002		Date of mailing of the international search report 18/03/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patenlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Novak, S

4

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 01/01892
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EBI 'Online! EMBL; 20 September 1999 (1999-09-20) STRAUSBERG R.: "Homo sapiens cDNA clone; mRNA sequence (similar to Nuclear Protein)" Database accession no. AW044467 XP002190547 the whole document</p>	1-11
X	<p>AIHARA YASUSHI ET AL: "Molecular cloning of rabbit CARP cDNA and its regulated expression in adriamycin-cardiomyopathy." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1447, no. 2-3, 28 October 1999 (1999-10-28), pages 318-324, XP002190543 ISSN: 0006-3002 abstract; figures 1-3</p>	1-11
X	<p>-&amp; DATABASE EBI 'Online! EMBL; AIHARA, Y. ET AL.: "CARP" Database accession no. Q9TU71 XP002190925 abstract</p>	1-11
Y	<p>ZOU Y ET AL: "CARP, A CARDIAC ANKYRIN REPEAT PROTEIN, IS DOWNSTREAM IN THE NKX2-5 HOMEODOMAIN GENE PATHWAY" DEVELOPMENT, COMPANY OF BIOLOGISTS, CAMBRIDGE, GB, vol. 124, 1997, pages 793-804, XP000863100 ISSN: 0950-1991 abstract; figures 1,2,9</p>	1-11
Y	<p>-&amp; DATABASE EBI 'Online! EMBL; ZOU, Y. ET AL.: "Cardiac ankyrin repeat protein mcarp" Database accession no. 055014 XP002190926 abstract</p>	1-11
Y	<p>CHU WEI ET AL: "Identification and Characterization of a Novel Cytokine-inducible Nuclear Protein from Human Endothelial Cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 17, 1995, pages 10236-10245, XP002190544 ISSN: 0021-9258 abstract; figure 1; table 1</p>	1-11

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/01892

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>REESE DAVID E ET AL: "Cloning and expression of hboves, a novel and highly conserved mRNA expressed in the developing and adult heart and skeletal muscle in the human." MAMMALIAN GENOME, vol. 10, no. 9, 1999, pages 913-915, XP002190545 ISSN: 0938-8990 ---</p>	
P,X	<p>KEMP T J ET AL: "Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein." GENOMICS, vol. 66, no. 3, 15 June 2000 (2000-06-15), pages 229-241, XP001055970 ISSN: 0888-7543 the whole document ---</p>	1-11
P,X	<p>DATABASE EBI 'Online! EMBL; 21 December 2000 (2000-12-21) PALLAVICINI A.: "H. sapiens mRNA for skel muscle ankyrin protein 2 (ANKRD2 gene)" Database accession no. AJ304805 XP002190548 the whole document -----</p>	1-11

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50		33/543	5 4 5 A
	33/53	A 6 1 K	45/00	
	33/543	A 6 1 P	9/00	
// A 6 1 K	45/00		43/00	1 0 5
A 6 1 P	9/00	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	43/00		5/00	A
(71)出願人	Frankfurter Str. 250, D - 64293 Darmstadt, Fed eral Republic of Ge rmany			
(72)発明者	クルクセン、 フランツ - ヴェルネル ドイツ連邦共和国 64367 ミュールタル バーンホフシュトラッセ 39			
Fターム(参考)	2G045 AA40 DA36 FB03 FB07 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA07 GA11 HA15 4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13 4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46 4C084 AA07 AA17 NA14 ZA36 ZA38 ZA40 ZA42 ZC02 4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 EA20 EA23 EA50 FA74			

专利名称(译)	新的转录因子CARP-2		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003523758A</a>	公开(公告)日	2003-08-12
申请号	JP2001562560	申请日	2001-02-20
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	クルクセンフランツヴェルネル		
发明人	クルクセン、フランツ-ヴェルネル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P9/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/4702		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/543.545.A A61K45/00 A61P9/00 A61P43/00.105 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA36 4C084/ZA38 4C084/ZA40 4C084/ZA42 4C084/ZC02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2000103790 2000-02-23 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了CARP-2多肽和多核苷酸以及通过重组方法生产这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用CARP-2多肽和多核苷酸的方法。

